

Nuevos compuestos de organismos marinos farmacológicamente activos



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Tesis Doctoral
Rosa M. Nieto Prieto
Departamento de Química Fundamental
Junio 2013

**Nuevos compuestos de
organismos marinos
farmacológicamente activos**

Rosa M. Nieto Prieto

Departamento de Química Fundamental

Facultade de Ciencias



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Departamento de Química Fundamental

Acta de Tesis

El tribunal, nombrado por el Excmo. Sr. Rector de la Universidade da Coruña para calificar la tesis doctoral titulada “***Nuevos compuestos de organismos marinos farmacológicamente activos***” dirigida por los Drs. Jaime Rodríguez González y Carlos Jiménez González, presentada por **Dña. Rosa María Nieto Prieto** y constituido en el día de la fecha por los miembros que subscriben la presente Acta, una vez efectuada la defensa por el doctorado y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por la calificación de:

En A Coruña, a..... de de 2013

EL PRESIDENTE

Dr. Isidro González Collado

Catedrático de Universidad. Departamento de
Química Orgánica.
Universidad de Cádiz

EL SECRETARIO

Dr. José M. Quintela López

Catedrático de Universidad. Departamento de
Química Fundamental.
Universidade da Coruña

Firmado

Firmado

VOCAL 1º

Dra. Isabel López Bazzocchi

Titular de Universidad.
Departamento de Química
Orgánica.
Universidad de La Laguna

VOCAL 2º

Dra. Emilia Tojo Suárez

Titular de Universidad.
Departamento de Química
Orgánica.
Universidad de Vigo

Vocal 3º

**Dra. Librada Cañedo
Hernández**

Investigadora Senior.
Pharmamar S. A.

Firmado

Firmado

Firmado

Doña Rosa María Nieto Prieto:

Presenta la memoria adjunta, titulada *“Nuevos compuestos de organismos marinos farmacológicamente activos”* para optar al grado de doctora en Química que ha sido realizada bajo la dirección de los profesores D. Carlos Jiménez González y D. Jaime Rodríguez González en los laboratorios del Departamento de Química Fundamental.

A Coruña, a 6 de abril de 2013.

Fdo. Rosa María Nieto Prieto

DON CARLOS JIMÉNEZ GONZÁLEZ, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Informa:

Que la memoria adjunta, titulada *“Nuevos compuestos de organismos marinos farmacológicamente activos”* para optar al grado de doctora en Química presentada por Rosa María Nieto Prieto, ha sido realizada en los laboratorios Thimann de la Universidad de California Santa Cruz y en el Departamento de Química Fundamental.

Y para que así conste, expide el presente certificado en A Coruña, a 6 de abril de 2013.

Fdo. Carlos Jiménez González

DON JAIME RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL, ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA, DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Y

DON CARLOS JIMÉNEZ GONZÁLEZ, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL, ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA, DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Informan:

Que la memoria adjunta, titulada *“Nuevos compuestos de organismos marinos farmacológicamente activos”* para optar al grado de doctora en Química presentada por Rosa María Nieto Prieto, ha sido realizada bajo su dirección en los laboratorios Thimann de la Universidad de California Santa Cruz y en el Departamento de Química Fundamental.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autoriza su presentación en la Universidad de A Coruña.

A Coruña, a 6 de abril de 2013.

Fdo. Jaime Rodríguez González

Fdo. Carlos Jiménez González

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al profesor Phil Crews porque me brindó la oportunidad de trabajar en su laboratorio donde comenzó este trabajo. A sus enseñanzas y su amistad a lo largo de estos años.

A mis directores de tesis, Dr. Carlos Jiménez y Dr. Jaime Rodríguez, por sus enseñanzas, dedicación paciencia, y porque con su valioso trabajo han hecho posible la finalización de este estudio.

A Jim Loo, Técnico de RMN y espectrometría de masas de la Universidad de California Santa Cruz, a los servicios de RMN de la Universidad de Santiago de Compostela y a los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña.

Al Centro de Supercomputación de la Xunta de Galicia (CESGA) por la concesión del programa CESGA ICTS 2012, con el que el telepunto vio por fin la luz.

Al NIH por las subvenciones CA52955 y CA47135, a la Xunta de Galicia por la concesión de los proyectos XUGA-10301A97, PGID106PXIC103118PN y 10PXIB235157PR. A los distintos Ministerios de Educación y Ciencia, de Ciencia e Innovación y ahora Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de los proyectos CQT2005-00793, CQT2008-04024/BQU y AGL2012-39274-C02-02.

Al Instituto Biomar por la realización de los estudios farmacológicos de citotoxicidad.

A mis compañeros de laboratorio en California Cristina Díaz, Andrea, Miranda, Lisa, Blaine, Mustafa, Sam, Leif, Dale Jarret, Susie por su apoyo en el laboratorio y su amistad.

A todos mis compañeros de la Universidad de A Coruña Noemí, Vanessa, Cristina, Paloma, Gilmar, Ana, Maribel, Yuri, Marcos y María que siempre han sido una ayuda y una buena compañía para llevar el trabajo en el laboratorio mucho mejor.

A mis padres por su cariño y su apoyo incondicional, a mi hermana por estar ahí siempre, a mi tía Carmen por su cariño.

A Jaime

A mis hijos Iago y Sergio

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

λ	Longitud de onda
$[\alpha]_D$	Rotación óptica específica
A549	Línea celular de carcinoma humano
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APT	Attached Proton Test Experimento de multiplicidad de ^{13}C
B-16	Línea celular de melanoma de ratón
c	Cuartete. En medidas de actividad óptica: concentración expresada en gramos por 100 mL
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Experimento de RMN bidimensional de correlación homonuclear protón-protón
δ (ppm)	Desplazamiento químico en partes por millón
d	Doblete
da	Doblete ancho
dd	Doble doblete
ddd	Doble doble doblete
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization transfer. Amplificación sin distorsión por transferencia de polarización
DFT	Density Functional Theory. Teoría de Funcionales de Densidad
EMEA	Agencia Europea Medicamentos
ESI	Ionización por electrospray
FAB	Ionización por bombardeo con átomos acelerados
FDA	Agencia de Alimentación y Fármacos de los EE.UU (Food and Drugs Administration)
FD	Fracción de Diclorometano
FH	Fracción de hexano
FM	Fracción de acuosa-metanólica
FT-IR	Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier
FT-MS	Espectrómetro de masas con transformada de Fourier
g	Gramo
HSQC-HECADE	(Heteronuclear Couplings from ASSCI-Domain Experiments with E.COSY-type crosspeaks) Experimento de correlación heteronuclear de medida de constante de acoplamiento mediante HSQC-TOCSY
HL-60	Línea celular de leucemia promielocítica humana
HMBC	(Heteronuclear Multiple-Bond Correlation). Experimento de correlación heteronuclear a larga distancia
HMQC	(Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation). Experimento de correlación heteronuclear directo mediante cuanto múltiple
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HREIMS	Espectrometría de masas de alta resolución, técnica de impacto electrónico
HT-29	Línea celular de carcinoma de colon
Hz	Hercios
IC ₅₀	Concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular

IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
MS	Espectro de masas
m/z	Relación masa carga
MEL-28	Línea celular de melanoma humano
mg	Milígramo
min	Minuto
mL	Mililitro
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy. Experimento bidimensional homonuclear de correlación nOe
NP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Normal
P-388	Línea celular de linfoma de ratón
Ref.	Referencia
PM	Peso molecular
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Invertida
s	Singlete
sa	Singlete ancho
t	Triplete
ta	Triplete ancho
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
WB	Fracción de <i>n</i> -BuOH
WW	Fracción acuosa

RESUMEN

Esta tesis doctoral describe diferentes métodos de aislamiento, estrategias para la determinación estructural, viabilidad de cultivo de esponjas y actividad farmacológica de una serie de productos naturales procedentes de organismos marinos.

Capítulo I. De la gorgonia *Briareum sp.* se aislaron los briaranos **1-10**. De la esponja *Dysidea sp.* se aisló el nuevo compuesto natural dysithiazolamida (**11**). Del anélido poliqueto *Thelepus crispus* se aisló un nuevo compuesto que se denominó como thelepamida (**13**). Este compuesto contiene un anillo de tiazolidinona cuya sustitución no tiene precedente alguno en la química de los productos naturales.

Capítulo II. Se estudió la viabilidad de que la esponja *Acanthella cavernosa* creciera en cautividad mediante un sistema de acuicultura. Con este fin, se hizo un estudio químico previo de la esponja directamente recolectada de su estado natural, aislándose siete diterpenos con esqueleto de kalihinenos (compuestos **14-20**) que no se habían descrito anteriormente en la bibliografía. Posteriormente se realizó un estudio cuantitativo de especímenes de la esponja *A. cavernosa* mantenidas en el laboratorio durante siete meses.

Las esponjas crecieron aumentando su biomasa, material celular y sus tejidos. Desafortunadamente el contenido de kalihinenos no se vio aumentado para ser considerado como un método de producción.

Capítulo III. En este capítulo se estudian mezclas de compuestos cuyas estructuras se determinaron mediante estudios de RMN, MS y de HPLC-FTMS, sin llegar a ser aislados como compuestos puros. De la esponja *Jaspis cf. coricea* se determinaron siete nuevos alcaloides (compuestos **24-30**) como mezclas inseparables de ésteres de ácidos grasos saturados de bengazoles. El estudio quimiotaxonómico de los tunicados *Aplidium meridianium* y *Aplidium falklandicum* permitió detectar, mediante la técnica HPLC acoplado a espectrometría de masas de alta resolución, y proponer las estructuras de una serie alcaloides con esqueleto de meridianinas que no habían sido publicadas hasta la fecha.

Se evaluó la citotoxicidad de todos los compuestos aislados pero sólo los compuestos **7, 13, 30 y 28** mostraron cierta actividad frente a diferentes líneas celulares.

RESUMO

Esta tese doctoral describe o illamento, determinación estrutural e actividade farmacolóxica dunha serie de produtos naturais procedentes de organismos mariños.

Capítulo I. Da gorgonia *Briareum* sp. illáronse os briaranos **1-10**. Os novos compostos naturais nunca antes descritos na bibliografía foron os compostos **1-3**.

Da esponxa *Dysidea* sp. illáronse un novo composto dysitiazolamida (**11**).

Do anélido poliqueto *Thelepus crispus* illouse un novo composto que no foi descrito na bibliografía e ao que denominamos thelepamida (**13**).

Capítulo II. Estudouse a viabilidade de que a esponja *Acanthella cavernosa* crecese mediante acuicultura. Con este fin fíxose un estudo químico previo da esponxa illándose sete compostos que non se describiron anteriormente na bibliografía. A continuación realizouse un estudo cuantitativo de esponxas individuais de *Acanthella cavernosa* que foron mantidas no laboratorio durante sete meses. As esponxas creceron aumentando a súa biomasa, o material celular e os seus texidos. A pesar de isto o contido dos kalihinoles non se veu aumentado para ser considerado coma un método de produción.

Capítulo III. Neste capítulo estúdanse mesturas de compostos cuxas estruturas se determinaron sen chegar a ser illados como compostos puros mediante estudos de RMN, MS e de HPLC-FTMS.

Da esponxa *Jaspis* cf. *coricea* determináronse sete compostos novos como mesturas inseparables de ésteres de ácidos grasos saturados de bengazoles. Co fin de levar a cabo un estudo quimiotaxonómico dos tunicados *Aplidium meridianium* e *Aplidium falklandicum*, detectáronse por HPLC adaptado a espectrometría de masas de alta resolución (FTMS) varios compostos cuxas estruturas tentativas propostas asináronse como meridianinas J-S. Asemade detectáronse os dímeros da meridianina A e das meridianinas B ó E.

Avaliouse a citotoxicidade de todos os compostos illados pero só os compostos **7, 13, 30 e 28** mostraron certa actividade fronte a diferentes liñas celulares tumorais.

Summary

This thesis dissertation describes the isolation, structural determination and pharmacological activities of a several natural products of marine origin.

Chapter I. From *Briareum* sp. gorgonian **1-10** briaranos were isolated. From the sponge *Dysidea* sp. The new natural compound dysithiazolamida (**11**) was isolated. From the polychaete annelid *Thelepus crispus* was isolated a new compound which was named as thelepamide (**13**). This compound contains a thiazolidinone ring whose substituents has no precedent in the chemistry of natural products.

Chapter II. The viability of aquaculture growing of *Acanthella cavernosa* was studied by means of cultured organisms cultured. A previous chemical study of the sponge gave the isolation of seven new compounds (**14-20**). Furthermore a quantitative study of individual sponges of *Acanthella cavernosa* was done in the laboratory facility for seven months.

The sponges grew increasing biomass, cellular material and tissues. Unfortunately the amounts of kalihinane compounds were not enough to be regarded as a production method.

Chapter III. In this chapter we study mixtures of compounds whose structures were determined by NMR studies, MS and HPLC-FTMS, without being isolated as pure compounds. From the sponge *Jaspis cf. coricea* we have identified seven new alkaloids (compounds **24-30**) as inseparable mixtures of saturated fatty acid esters of bengazoles. The chemotaxonomic study of tunicates *Aplidium meridianum* and *Aplidium falklandicum*, using HPLC technique coupled to high resolution mass spectrometry, allowed to propose alkaloids with meridianins skeleton that had not been published to date.

Cytotoxicity was assessed in all isolated compounds but only compounds **7**, **13**, **30** and **28** showed some activity against various cell lines.

INDICE

Sinopsis	1
Introducción	19
Capítulo I	47
Aislamiento de nuevos compuestos naturales de organismos marinos	
I.1 Objetivos	49
I.2 Resultados y discusión	51
I.2.1 Estudio del coral blando <i>Briareum</i> sp.	53
I.2.1.1 Antecedentes. Los esqueletos diterpénicos en los corales blandos	57
I.2.1.2 Estudio químico de <i>Briareum</i> sp.	62
I.2.1.2.1 Identificación y clasificación	62
I.2.1.2.2 Extracción y fraccionamiento	63
I.2.1.2.3 Aislamiento y purificación	64
I.2.1.2.4 Determinación estructural	65
I.2.1.2.4.1 13-Deshidroxiestechólido J (1)	66
I.2.1.2.4.2 2,9-Diacetil-2-desbutirilestechólido H (2)	74
I.2.1.2.4.3 Acetato de 2β-acetoxi-2-(desbutiriloxi)estechólido E (3)	81
I.2.1.2.4.4 Otros compuestos aislados (4-10)	83
I.2.1.2.4.5 Actividad biológica	84
I.2.2 Estudio de la Esponja <i>Dysidea</i> sp.	85
I.2.2.1 Introducción: derivados clorados de la esponja <i>Dysidea</i> sp	87
I.2.2.1.1 Simbiosis	87
I.2.2.2 Estudio químico de la esponja <i>Dysidea</i> sp.	90
I.2.2.2.1 Identificación y clasificación	90
I.2.2.2.2 Extracción y fraccionamiento	90
I.2.2.2.3 Aislamiento y purificación	91
I.2.2.2.4 Determinación estructural	91
I.2.2.2.4.1 Dysitiazolamida (11)	91
I.2.2.2.4.2 Otros compuesto aislados: dysidenina (12)	99
I.2.2.2.4.3 Resultados farmacológicos	100

I.2.3 Estudio del anélido poliqueto <i>Thelepus crispus</i>	101
I.2.3.1 Antecedentes bibliográficos de gusanos de origen marino	103
1.2.3.1.1 Antecedentes bibliográficos del anélido poliqueto <i>Thelepus crispus</i>	106
I.2.3.2 Estudio químico del anélido poliqueto <i>Thelepus crispus</i>	107
I.2.3.2.1 Identificación y clasificación	107
I.2.3.2.2 Extracción y fraccionamiento	107
I.2.3.2.3 Aislamiento y purificación	108
I.2.3.2.4 Determinación estructural	108
I.2.3.2.4.1 Thelepamida (13)	109
I.2.3.2.5 Determinación de la estereoquímica relativa de thelepamida	114
I.2.3.2.6 Ruta biogenética	132
I.2.3.2.7 Actividad antitumoral de thelepamida (13)	132
I.3 Conclusiones del capítulo I	133
 Capítulo II	135
Estudio de acuicultura de la esponja <i>Acanthella cavernosa</i>	
II.1 Objetivos	137
II.2 Antecedentes bibliográficos	138
II.2.1 Acuicultura en organismos marinos	140
II.2.2 Proyecto de acuicultura sobre la esponja <i>Acanthella cavernosa</i>	141
II.3 Resultados y discusión	143
 II.3.1 Estudio químico de <i>Acanthella cavernosa</i> en su hábitat natural	145
II.3.1.1 Identificación y clasificación de la esponja	147
II.3.1.2 Extracción y fraccionamiento	148
II.3.1.3 Aislamiento y purificación	149
II.3.1.4 Determinación estructural	150
II.3.1.4.1 10-Formamidokalihineno (14)	151
II.3.1.4.2 15-Formamidokalihineno (15)	157
II.3.1.4.3 10,15-Bisformamidokalihineno (16)	160
II.3.1.4.4 6-Hidroxikalihineno (17)	162
II.3.1.4.5 6-Hidroxi-15-formamidokalihineno (18)	167
II.3.1.4.6 6-Hidroxi-10-formamidokalihineno (19)	170
II.3.1.4.7 6-Hidroxi-10-formamido-15-isoticianokalihineno (20)	173
II.3.1.4.8 Otros compuestos aislados (21-23)	175
II.3.1.4.9 Esquema biogenético	176

II.3.2 Estudio químico individual de especímenes de <i>A. cavernosa</i> cultivados en laboratorio	177
II.3.2.1 Recolección y cultivo en laboratorio: protocolos utilizados	179
II.3.2.2 Evaluación de la producción de los kalihinenos en esponjas cultivadas bajo diferentes condiciones	182
II.3.2.2.1 Estudio químico de las esponjas individuales	182
II.3.2.2.2 Efectos de los protocolos en la producción de kalihinenos en las esponjas cultivadas	184
II.3.2.3 Publicaciones de kalihinenos posteriores a este estudio.	190
II.4 Conclusiones del capítulo II	191
Capítulo III	193
Determinación de las estructuras de productos naturales presentes en mezclas complejas procedentes de organismos marinos	
III.1 Objetivos	195
III.2 Resultados y discusión	197
III.2.1 Estudio de la esponja <i>Jaspis cf. coricea</i>	199
III.2.1.1 Antecedentes bibliográficos	201
III.2.1.2 Estudio químico de <i>Jaspis cf. coricea</i>	202
III.2.1.2.1 Identificación y clasificación	202
III.2.1.2.2 Extracción y fraccionamiento	203
III.2.1.2.3 Aislamiento y purificación	204
III.2.1.2.4 Determinación estructural	205
III.2.1.2.4.1 Hidrólisis de las mezclas de bengazoles: Bengazol Z (33)	206
III.2.1.2.4.2 Estudio de las fracciones mezcla	210
III.2.1.2.4.2.1 Fracción mezcla 1 (FDF7H2H2)	211
Bengazol C ₂ (24)	
Bengazol C ₆ (30)	
III.2.1.2.4.2.2 Fracción mezcla 2 (FDF7H2H1)	216
Bengazol C ₂ (24)	
Bengazol C ₃ (26)	
Bengazol C ₄ (28)	
III.2.1.2.4.2.3 Fracción mezcla 3 (FDF7H3H2)	222
Bengazol D ₂ (25)	
Bengazol D ₃ (27)	
Bengazol D ₄ (29)	
Bengazol C ₆ (30)	
III.2.1.2.5 Actividad biológica	231
III.2.1.2.6 Otros bengazoles aislados posteriormente a este trabajo	232

III.2.2 Estudio de los extractos de las ascidias <i>Aplidium falklandicum</i> y <i>Aplidium meridianum</i> mediante LC-MS	235
III.2.2.1 Antecedentes bibliográficos	237
III.2.2.2 Estudio químico de <i>Aplidium falklandicum</i> y <i>Aplidium meridianum</i>	240
III.2.2.2.1 Identificación y clasificación	240
III.2.2.2.2 Extracción y fraccionamiento	241
III.2.2.2.3 Cuantificación de meridianinas A-G	241
III.2.2.2.4 Estudio de las nuevas meridianinas mediante LC-MS	243
III.2.2.2.4.1 HPLC-MS de la fracción MC4	244
III.2.2.2.4.2 HPLC-MS de la fracción MC5	249
III.2.2.2.4.3 HPLC-MS de la fracción MC6	251
III.2.2.2.4.4 HPLC-MS de la fracción MC7	253
III.2.2.2.4.5 HPLC-MS de la fracción MC8	255
III.2.2.2.5 Compuestos aislados de <i>Aplidium meridianum</i>	258
III.3 Conclusiones del capítulo III	260
 Capítulo IV	261
 Parte experimental	
 IV.1 Procedimientos generales	263
 IV.2 Parte experimental Capítulo I	
IV.2.1 Parte experimental del coral blando <i>Briareum</i> sp.	264
IV.2.2 Parte experimental de la esponja <i>Dysidea</i> sp.	267
IV.2.3 Parte experimental del gusano <i>Thelepus crispus</i>	269
 IV.3 Parte experimental Capítulo II	
IV.3.1 Estudio de las esponjas <i>A. cavernosa</i> recolectadas directamente de su hábitat natural	271
IV.3.2 Estudio de las esponjas <i>Acanthella cavernosa</i> cultivadas	280
IV.3.2.1 Sistema de acuicultura empleado en el cultivo de la esponja <i>Acanthella cavernosa</i>	280
IV.3.2.2 Extracción y fraccionamiento	283
 IV.4 Parte experimental Capítulo III	
Determinación de la estructuras de productos naturales marinos bioactivos de esponjas a partir de mezclas de compuestos	
IV.4.1 Parte experimental de la esponja <i>Jaspis cf coricea</i>	285
IV.4.1.1 Hidrólisis de las fracciones-mezclas FDF7H2H1, FDF7H2H2 y FDF7H3H2	286
IV.4.2 Parte experimental de los tunicados <i>Aplidium falklandicum</i> y <i>Aplidium meridianum</i>	289
 Anexo: Coordenadas XYZ de las geometrías de los mínimos DFT de los modelos 13a, 13b, 13c y 13d	291

Sinopsis

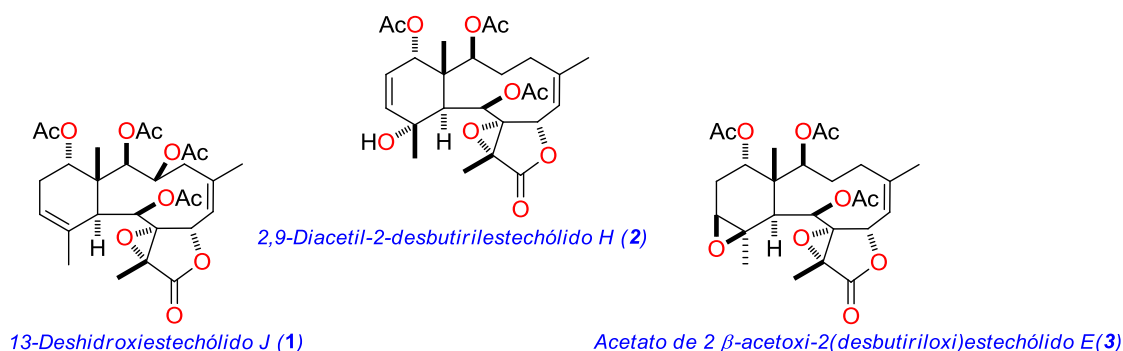
Sinopsis

Esta tesis doctoral describe diferentes métodos de aislamiento, estrategias para la determinación estructural, viabilidad de cultivo de esponjas y las actividades farmacológicas encontradas de una serie de productos naturales procedentes de organismos marinos.

Capítulo I

Se estudiaron tres organismos: el coral blando *Briareum* sp., la esponja *Dysidea* sp. y el anélido poliqueto *Thelepus crispus*, de los que se aislaron una serie de compuestos que resultaron muchos de ellos nuevos compuestos naturales. Las estructuras se elucidaron, principalmente, mediante el uso de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear y de la espectrometría de masas.

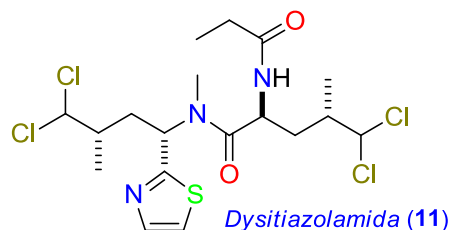
De la gorgonia *Briareum* sp. se aislaron los briaranos **1-10** cuya evaluación citotóxica mostró que estechólido L (**7**) posee una moderada actividad citotóxica frente a las células tumorales P-388 (IC₅₀ de 10 µg/mL), A-549 (IC₅₀ de 2.5 µg/mL), HT-29 (IC₅₀ de 5 µg/mL) y MEL-28 (IC₅₀ de 5 µg/mL), mientras que los compuestos **1-6**, **9** y **10** no mostraron actividad citotóxica frente a esas células tumorales a concentraciones menores de 10 µg/ml. Los compuestos naturales **1-3** cuyas estructuras se muestran a continuación resultaron ser nuevos productos naturales:



Los resultados de estos estudios dieron lugar a la siguiente publicación:

-New Briarane Stecholid Diterpenes from the Indonesian Gorgonian *Briareum* sp. Rodríguez J., Nieto R. M., Jiménez C. J. *Nat. Prod.* **1998**, *61*, 314.

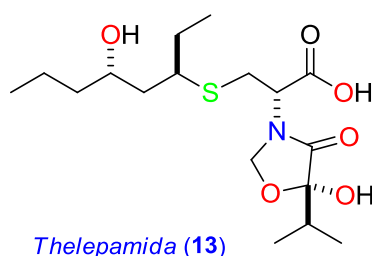
De la esponja *Dysidea* sp. se aisló el nuevo compuesto natural dysitiazolamida (**11**) junto con el ya descrito en la bibliografía dysidenina (**12**), cuya identificación de su estructura plana fue realizada por métodos bidimensionales de RMN y espectrometría de masas. La determinación de su estereoquímica relativa y absoluta se dedujo por la aplicación de la metodología de Murata sobre sistemas 1,3 quirales acíclicos nitrogenados y mediante argumentos biogenéticos respectivamente. Su estructura fue confirmada por la síntesis total realizada por miembros de nuestro grupo de investigación.



Los resultados de estos estudios dieron lugar a la siguiente publicación:

-NMR J-based analysis of nitrogen-containing moieties and application to dysithiazolamide, a new polychlorinated dipeptide from *Dysidea* sp. Ardá A., Rodríguez J., Nieto R., Bassarello C., Gomez-Paloma L., Bifulco G., Jiménez C. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10093.

Del anélido poliqueto *Thelepus crispus* se aisló un nuevo compuesto al que hemos denominado thelepamida (**13**) el cual contiene un anillo de tiazolidinona cuya sustitución no tiene precedente alguno en la química de los productos naturales. Su estructura tridimensional se obtuvo por estudio de sus constantes de acoplamiento heteronucleares y por métodos computacionales basados en la teoría de funcionales de densidad (DFT).

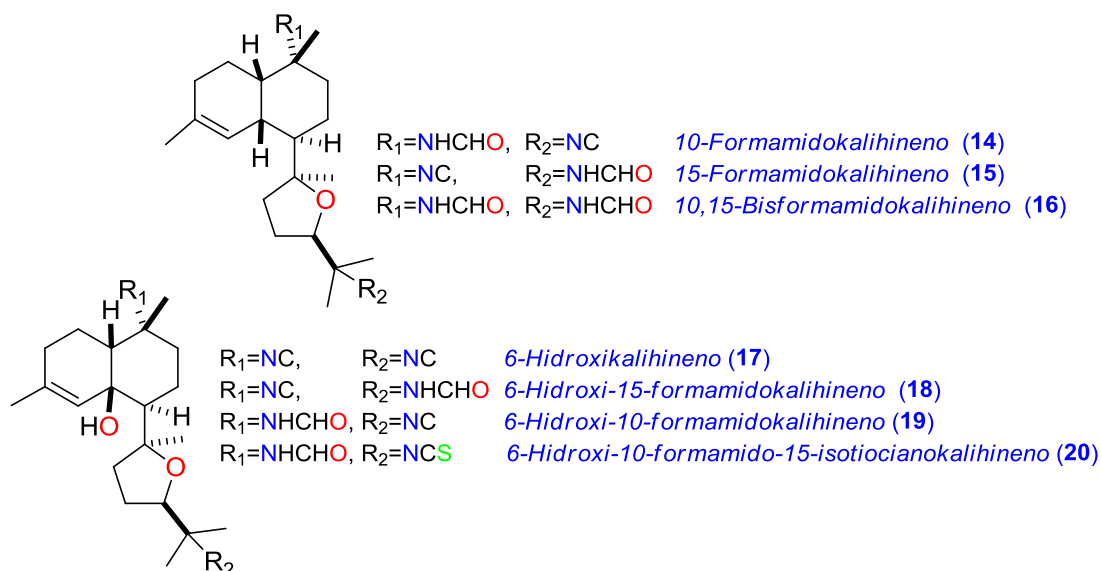


Este compuesto dará lugar a la siguiente publicación:

-Thelepamide: An Unprecedented Cytotoxic Dipeptide from Polychetae Annelid *Thelepus crispus*. Rodriguez J., Nieto R.M., Jiménez C., Crews P.

Capítulo II

Se estudió la viabilidad de que la esponja *Acanthella cavernosa* fuera cultivada mediante un método de acuicultura. Con este fin se hizo un estudio químico previo de la esponja directamente recolectada en su estado natural, aislándose de esta manera siete diterpenos de esqueleto kalihinano que no se habían descrito anteriormente en la bibliografía y cuyas estructuras se muestran a continuación:



Posteriormente se realizó un estudio cuantitativo de esponjas individuales de *Acanthella cavernosa*, las cuales fueron mantenidas en un sistema de acuicultura en laboratorio durante siete meses.

Se observó que las esponjas sobrevivían en el sistema y estas aumentaban su masa celular. Se sometieron a varios protocolos para intentar que hubiese un aumento en la producción de kalihinenos, pero este no se produjo de manera considerable por lo que se dedujo que no es un método adecuado para producir este tipo de metabolitos secundarios en grandes cantidades.

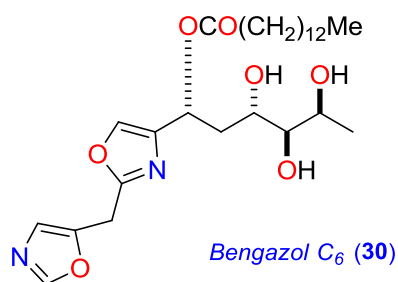
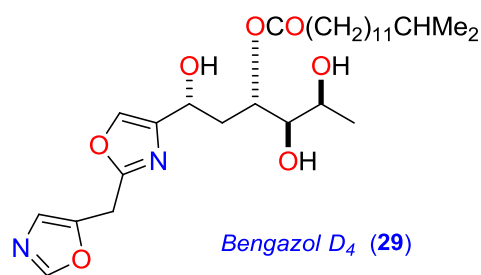
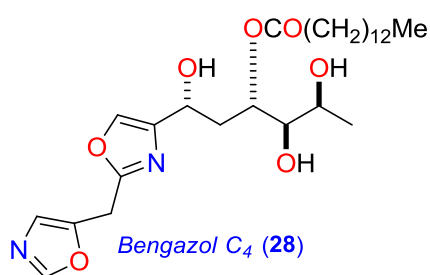
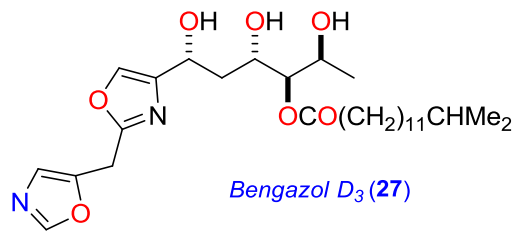
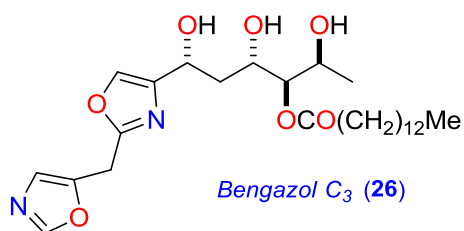
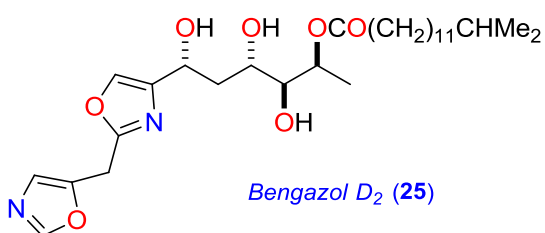
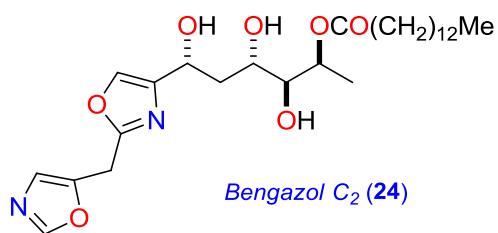
Estos estudios han dado lugar a la siguiente publicación:

-“Variation Among Known Kalihinol and New Kalihinene Diterpenes from the Sponge *Acanthella Cavernosa*”. Rodríguez J., Nieto R. M., Hunter L. M., Díaz M. C., Crews, P. *Tetrahedron* **1994**, 50, 11079.

Capítulo III

En este capítulo se estudiaron mezclas de compuestos cuyas estructuras fueron determinadas sin llegar a aislarlos como puros mediante estudios de RMN, MS y de HPLC-FTMS.

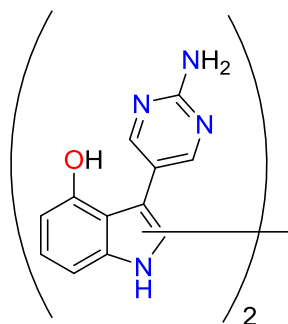
De la esponja *Jaspis cf. coricea* se determinaron por estudios de RMN siete compuestos nuevos como mezclas inseparables de ésteres de ácidos grasos saturados derivados de bengazol:



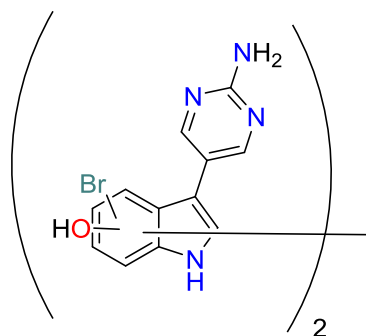
Como resultado de estos estudios fue la siguiente publicación:

“New structures and bioactivity patterns of bengazole alkaloids from a *Choristid* Marine sponge”
Rodríguez J., Nieto R., Crews P. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 2034.

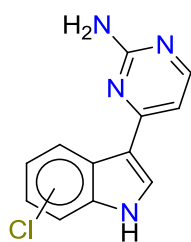
Con el fin de llevar a cabo un estudio quimiotaxonómico de los tunicados *Aplidium meridianum* y *Aplidium falklandicum*, se detectaron por HPLC acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (FTMS) los siguientes compuestos:



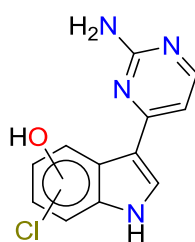
*Posible dímero de
meridianina A*



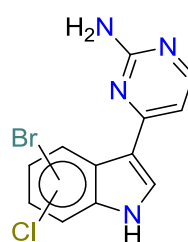
*Posible estructura del dímero de
meridianina B ó E*



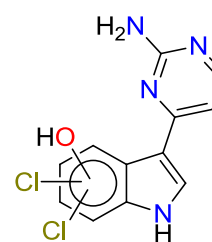
Meridianina I



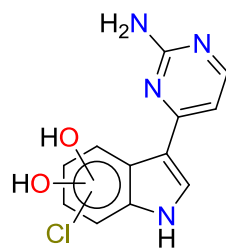
*Meridianina J
Meridianina J'*



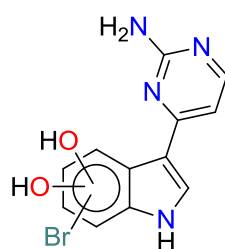
Meridianina K



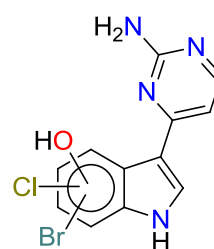
Meridianina L



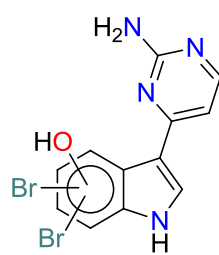
Meridianina O



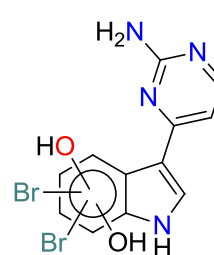
Meridianina P



*Meridianina Q
Meridianina Q'*



*Meridianina R
Meridianina R'*



Meridianina S

Las estructuras son tentativas ya que sólo se conocen sus fórmulas moleculares y se han propuesto en base a la presencia en su mismo extracto de la meridianinas conocidas A-G:

Estos estudios dieron lugar a las siguientes publicaciones:

-Chemical defenses of tunicates of the genus *Aplidium* from the Weddell Sea (Antarctica). Núñez-Pons L., R. Forestieri R., Nieto R. M., Varela M., Nappo M., J. Rodríguez J., Jiménez C., Castelluccio F., Carbone M., Ramos-Espla A., Gavagnin M., Avila C. *Polar Biol.* **2010**, 33, 1319.

-Natural Products from Antarctic Colonial Ascidians of the Genera *Aplidium* and *Synoicum*: Variability and Defensive Role. Núñez-Pons L., Carbone, M., Vázquez J., Rodríguez J., Nieto R. M., Varela M., Gavagnin M., Avila C. *Mar. Drugs* **2012**, 10, 1.

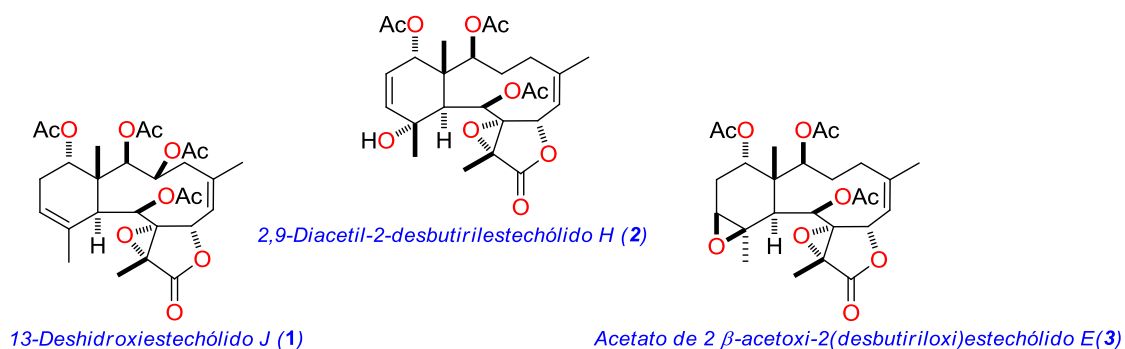
Resumo

Esta tese doctoral describe o illamento, determinación estrutural e actividade farmacolóxica dunha serie de produtos naturais procedentes de organismos mariños.

Capítulo I

Estudáronse tres organismos: o coral brando *Briareum* sp., a esponxa *Dysidea* sp., e o anélido poliqueto *Thelepus crispus* dos que se illaron unha serie de compostos que resultaron moitos deles novos compostos naturais. As estruturas elucidáronse principalmente mediante o uso da espectroscopia de resonancia magnética nuclear e da espectrometría de masas.

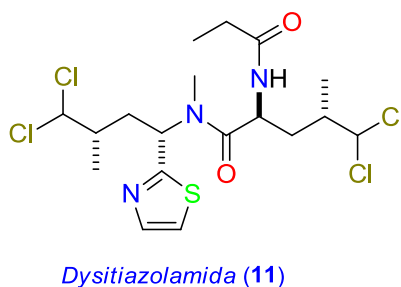
Da gorgonia *Briareum* sp. illáronse os briaranos **1-10** cuxas avaliación citotóxica mostrou que estechólido L (**7**) posee unha débil actividade citotóxica fronte a las células tumorais P-388 (IC₅₀ de 10 µg/mL), A-549 (IC₅₀ de 2.5 µg/mL), HT-29 (IC₅₀ de 5 µg/mL) e MEL-28 (IC₅₀ de 5 µg/mL), mentras que os compostos **4-6**, **9** e **10** no mostraron actividade citotóxica a concentracións menores de 10 µg/ml. Os novos compostos naturais nunca antes descritos na bibliografía foron os compostos **1-3**. A continuación resúmense todas as súas estruturas:



Os resultados destes estudos deron lugar á seguinte publicación:

-New Briarane Stecholid Diterpenes from the Indonesian Gorgonian *Briareum* sp." Rodríguez J., Nieto R. M., Jiménez C. J. *Nat. Prod.* **1998**, 61, 314-317.

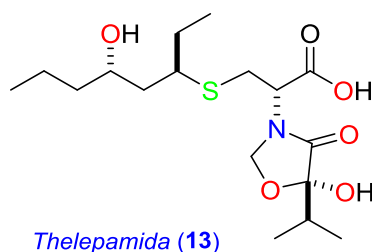
Da esponxa *Dysidea* sp. illáronse os seguintes compostos: dysitiazolamida (**11**), un novo composto natural xunto coa dysidenina (**12**) xa descrita na bibliografía:



Os resultados destes estudos deron lugar á seguinte publicación:

-NMR J-based analysis of nitrogen-containing moieties and application to dysithiazolamide, a new polychlorinated dipeptide from *Dysidea* sp. Ardá A., Rodríguez J., Nieto R., Bassarello C., Gomez-Paloma L., Bifulco G., Jiménez C. *Tetrahedron* **2005**, 61,10093–10098

Do anélido poliqueto *Thelepus crispus* illouse un novo composto que no foi descrito na bibliografía e ao que denominamos thelepamida (**13**) que contén un anel de tiazolidinona cunha substitución que non ten precedente algún na química dos produtos naturais:

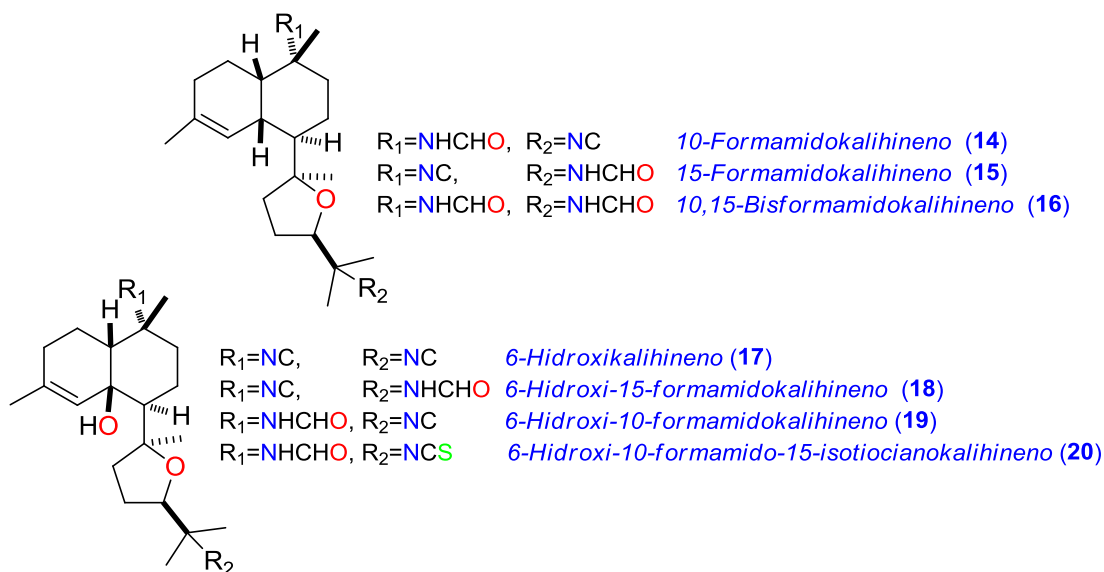


Este composto dará lugar a publicación:

-Thelepamide: An Unprecedented Cytotoxic Dipeptide from Polychetae Annelid *Thelepus crispus*. Rodriguez J., Nieto R.M., Jiménez C., Crews P.

Capítulo II

Estudouse a viabilidade de que a esponja *Acanthella cavernosa* crecese mediante acuicultura. Con este fin fíxose un estudo químico previo da esponja directamente recolectada do seu estado natural, illándose sete compostos (**14-20**) que non se describiron anteriormente na bibliografía:



A continuación realizouse un estudo cuantitativo de esponxas individuais de *Acanthella cavernosa* que foron mantidas no laboratorio durante sete meses.

Conclúíuse que as esponxas sobrevivían no sistema de acuicultura e aumentaban a súa masa. Sometéronse a varios protocolos para intentar que producisen máis kalihinenos pero non se produciu un incremento considerable para ter en conta este método como produtor de kalihinenos.

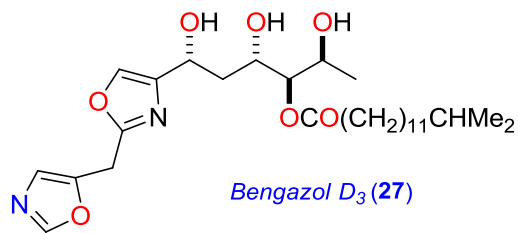
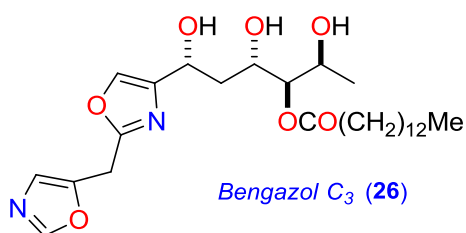
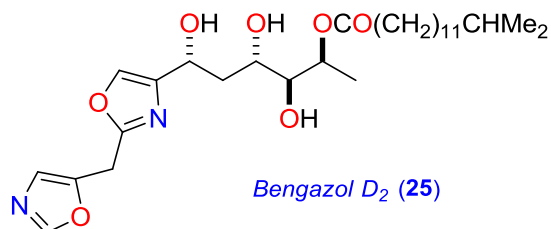
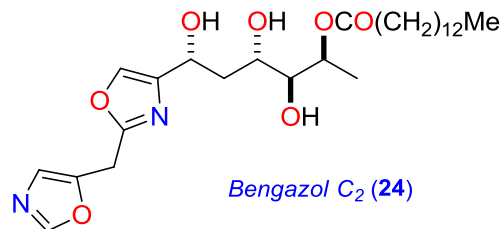
Os resultados destes estudos deron lugar á seguinte publicación:

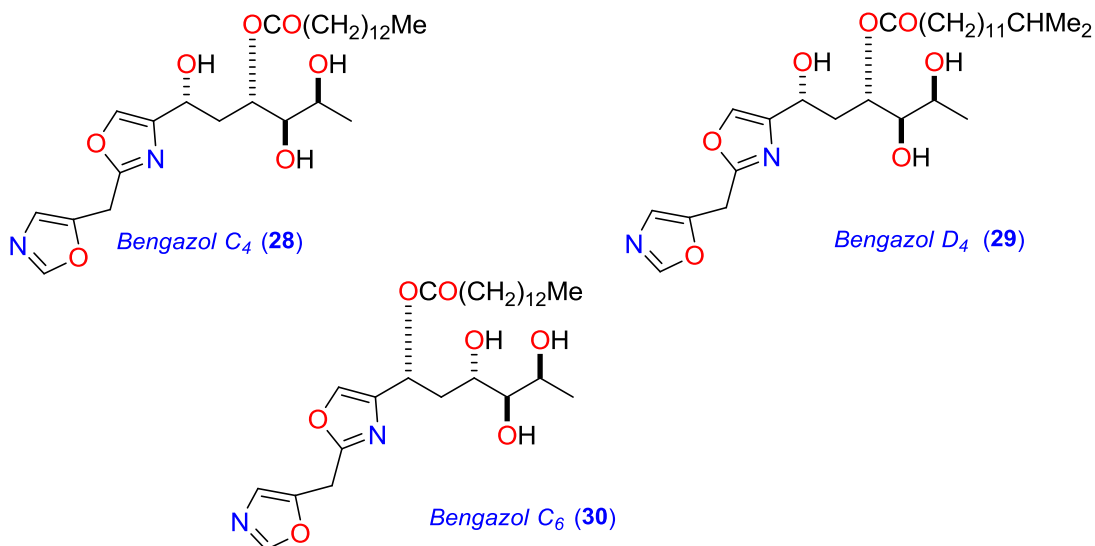
-“Variation Among Known Kalihinol and New Kalihinene Diterpenes from the Sponge *Acanthella Cavernosa*”. Rodríguez J., Nieto R. M., Hunter L. M., Díaz M. C., Crews P. *Tetrahedron* **1994**, 50, 11079.

Capítulo III

Neste capítulo estúdanse mesturas de compostos cuxas estruturas se determinaron sen chegar a ser illados como compostos puros mediante estudos de RMN, MS e de HPLC-FTMS.

Da esponxa *Jaspis cf. coricea* determináronse os sete compostos novos como mesturas inseparables de ésteres de ácidos grasos saturados de bengazoles:

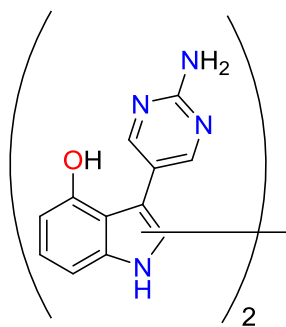




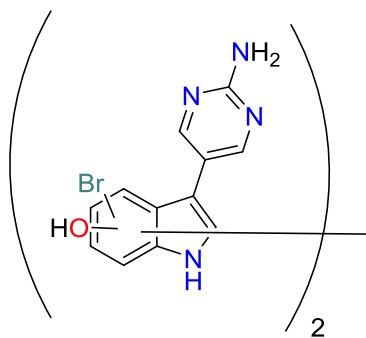
Os resultados destes estudos deron lugar á seguinte publicación:

–“New structures and bioactivity patterns of bengazole alkaloids from a *Choristid* Marine sponge”
Rodríguez J., Nieto R., Crews P. J. *Nat. Prod.*, **1993**, 56, 2034-2040.

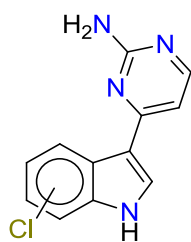
Co fin de levar a cabo un estudo quimiotaxonómico dos tunicados *Aplidium meridianum* e *Aplidium falklandicum*, detectáronse por HPLC adaptado a espectrometría de masas de alta resolución (FTMS) os seguintes compostos obtidos por fraccionamento de extractos alcohólicos destes organismos cuxas estruturas propostas foron as seguintes:



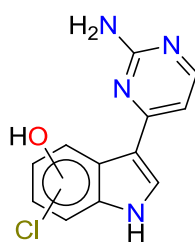
Possible dimer of
meridianina A



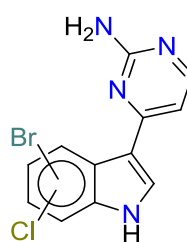
Possible structure of the dimer of
meridianina B ó *E*



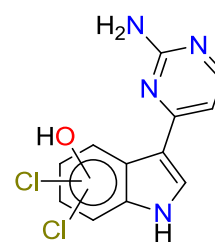
Meridianina I



Meridianina J
Meridianina J'



Meridianina K



Meridianina L

-Chemical defenses of tunicates of the genus *Anplidium* from the Weddell Sea (Antarctica)” Núñez-Pons I-Natural Products from Antarctic Colonial Ascidians of the Genera *Anplidium* and *Synopicum*: Variability and

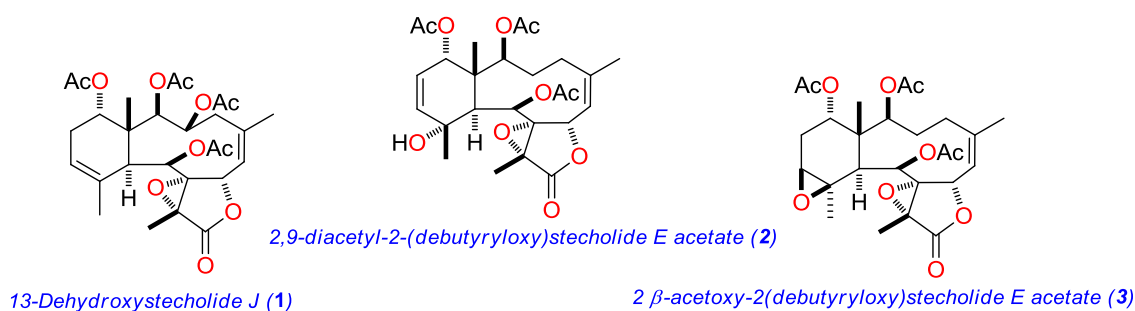
Summary

This Thesis Dessirtation describes the isolation, structural determination and some pharmacological activities of a serie of natural products from marine origin, as well as the studies developed in the harvest of the marine sponge *Acanthella cavernosa*.

Chapter I

Three marine organisms were studied: the soft coral *Briareum* sp., the sponge *Dysidea* sp., and the marine worm *Thelepus crispus* from which we were able to isolate several compounds that turned out to be new natural compounds. The structures were principally elucidated by means of the nuclear magnetic resonance (NMR) methods, molecular modeling and mass spectrometry (MS).

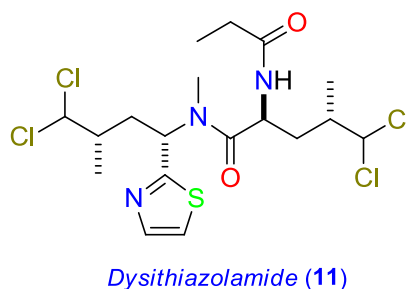
From the Indonesian gorgonia *Briareum* sp. briaranes **1-10** were isolated. Their cytotoxic activities were tested showing that just estecholide L (**7**) showed a moderate activity against tumour cells: P-388 (IC₅₀ 10 $\mu\text{g/mL}$), A-549 (IC₅₀ 2.5 $\mu\text{g/mL}$), HT-29 (IC₅₀ 5 $\mu\text{g/mL}$) and MEL-28 (IC₅₀ de 5 $\mu\text{g/mL}$). The new natural compounds **1-3** found to be new natural products which structures are shown below:



The results of this study were published in:

-“New Briarane Stecholide Diterpenes from the Indonesian Gorgonian *Briareum* sp.” Rodríguez J., Nieto R. M., and Jiménez, C. J. *Nat. Prod.* **1998**, 61, 314.

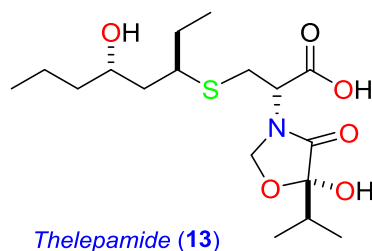
From the sponge *Dysidea* sp. a new natural compound dysithiazolamide (**11**) was isolated along with the already described in the literarture dysidenin (**12**). The structural identification was done by the application of 2D NMR experiments and the use of the *J* based analysis (JBA).



The results of these studies were published in:

-NMR J-based analysis of nitrogen-containing moieties and application to dysithiazolamide, a new polychlorinated dipeptide from *Dysidea* sp. Ardá A., Rodríguez J., Nieto R., Bassarello C., Gomez-Paloma L., Bifulco G., Jiménez C. *Tetrahedron* **2005**, 61,10093.

From the marine worm *Thelepus crispus* was isolated a new compound named thelepamide (**13**). The most important feature of this metabolite is an unprecedented skeleton as well as the cytotoxic activity found against leukemia tumour cell lines. The structure contains a thiazolidinone ring whose substitution does not have any precedent in the Chemistry of the Marine Natural Products:

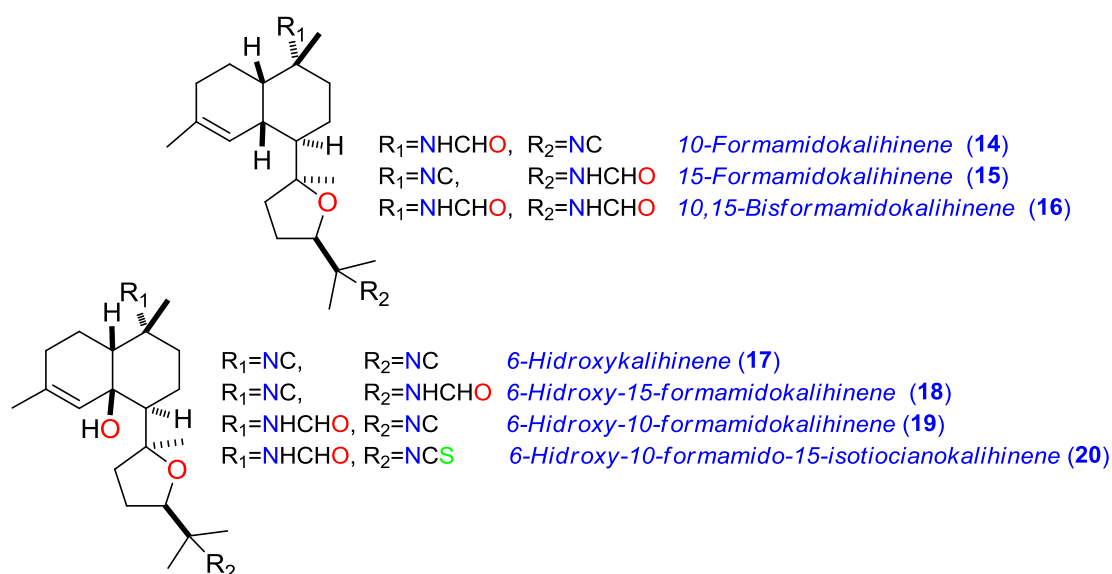


The results of this study will be published elsewhere:

-Thelepamide: An Unprecedented Cytotoxic Dipeptide from Polychetae Annelid *Thelepus crispus*.
Rodríguez J., Nieto R.M., Jiménez C., Crews P.

Chapter II

In this chapter we described the development of a controlled aquacultured system designed for the production of quantities of biomass of the marine sponge *Acanthella cavernosa*. The production of secondary metabolites was contrasted against wild sponges which produced seven new kalihinol-type compounds (**14-20**). The chemical structures of these compounds are:



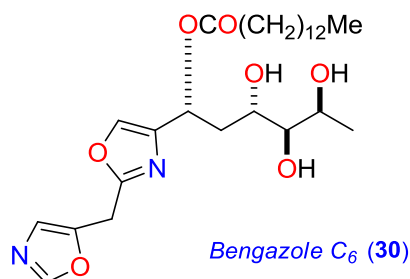
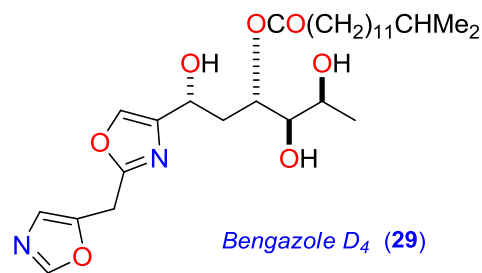
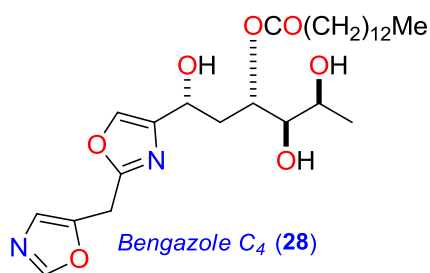
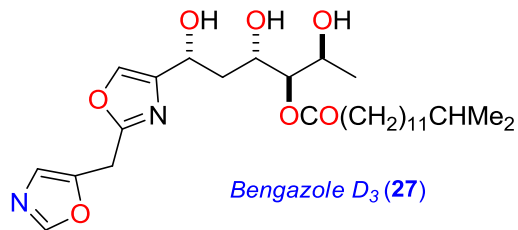
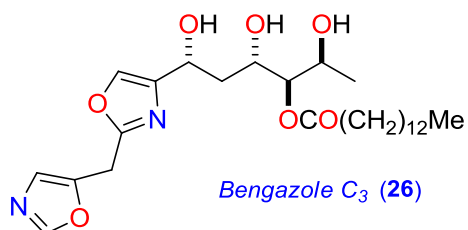
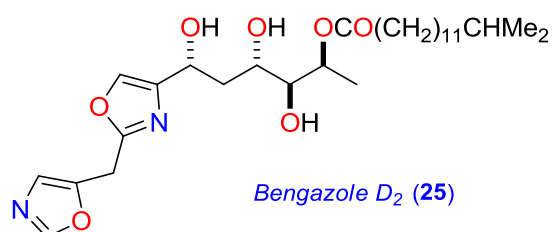
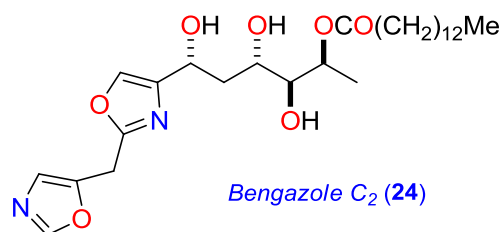
Later, a quantitative study of individual sponges of *Acanthella cavernosa* was done in a laboratory-aquaculture system during seven months.

The result of this chapter was published in:

-Variation Among Known Kalihinol and New Kalihinene Diterpenes from the Sponge *Acanthella Cavernosa*. Rodríguez, J.; Nieto, R. M.; Hunter, L. M.; Díaz, M. C.; Crews, P. *Tetrahedron* **1994**, 50, 11079.

Chapter III

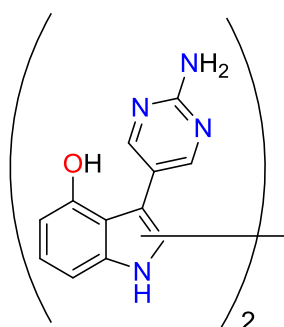
In this chapter we studied mixtures of compounds which that we were not able to purified as pure compounds. The structures of these compounds were deduced by means of NMR, MS and HPLC-FTMS experiments. From the sponge *Jaspis cf. coricea* seven new compounds were elucidated as inseparable mixtures of miristate and methylmiristate ester of bengazole Z.



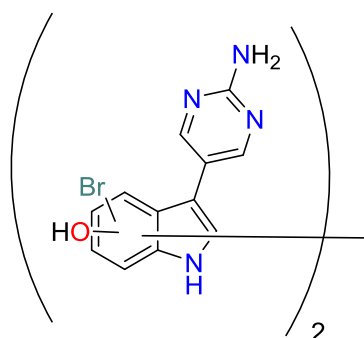
As a result these studies were published in:

-“New structures and bioactivity patterns of benzazole alkaloids from a *Choristid* Marine sponge”
Rodríguez J., Nieto R., Crews P. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 2034.

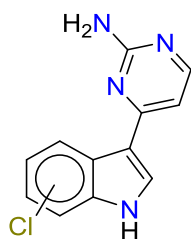
In order to carry out a chemotaxonomic study of the tunicates *Aplidium meridianum* and *Aplidium falklandicum*, we have studied from their alcoholic extracts by HPLC connected to high resolution mass spectrometry, the presence of new meridianin metabolites. The proposed structures were based on their relations to the known compounds meridianins A-G:



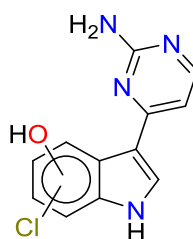
Proposed dimer of meridianin A



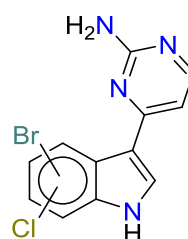
Proposed dimer of meridianin B or E



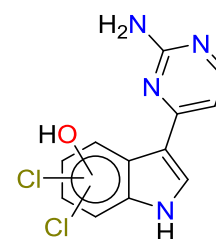
Meridianin I



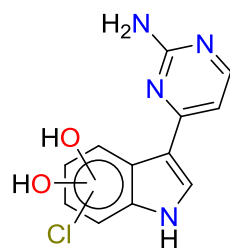
Meridianin J
Meridianin J'



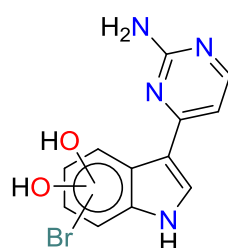
Meridianin K



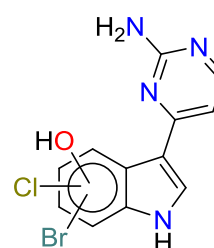
Meridianin L



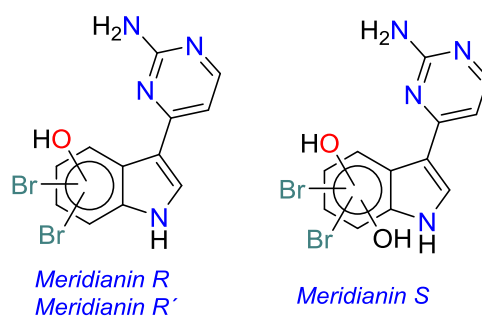
Meridianin O



Meridianin P



Meridianin Q
Meridianin Q'



The structures are tentative since only their molecular formulae were detected on the basics of known meridianins. We have proposed structures and functional groups substitutions:

The results of these studies were presented in the following publications:

-Chemical defenses of tunicates of the genus *Aplidium* from the Weddell Sea (Antarctica)" Núñez-Pons L., Forestieri R., Nieto R. M., Varela M., Nappo M., Rodríguez J., Jiménez C., Castelluccio F., Carbone M., Ramos-Espla A., Gavagnin M., Avila C. *Polar Biol.* **2010**, 33:1319.

-Natural Products from Antarctic Colonial Ascidians of the Genera *Aplidium* and *Synoicum*: Variability and Defensive Role" Núñez-Pons L., Carbone M., Vázquez J., Rodríguez J., Nieto R. M., Varela M., Gavagnin M., Avila C. *Mar. Drugs* **2012**, 10, 1.

INTRODUCCIÓN



El inicio de la búsqueda de agentes farmacológicos procedentes de organismos marinos se impulsó a partir de un pequeño congreso organizado en 1967 en Rhode Island, EEUU, con el ambicioso título *Drogas procedentes del mar*.¹ El título ha sobrevivido a lo largo de las décadas como una metáfora y ha quedado como un eco del pasado. El desarrollo de fármacos cuya fuente son productos naturales de origen marino se ha ido convirtiendo en una realidad, tal como lo demuestra el auge que tuvo este campo en los últimos cuarenta años. Esta exploración se ha justificado por la gran cantidad de compuestos marinos aislados, estudiados y desarrollados. Un ejemplo de estos compuestos es el ácido okadaico, un compuesto producido por dinoflagelados que actúa como inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 y 2A ó la xestospongina C, un metabolito de una esponja marina con actividad bloqueante intercelular.

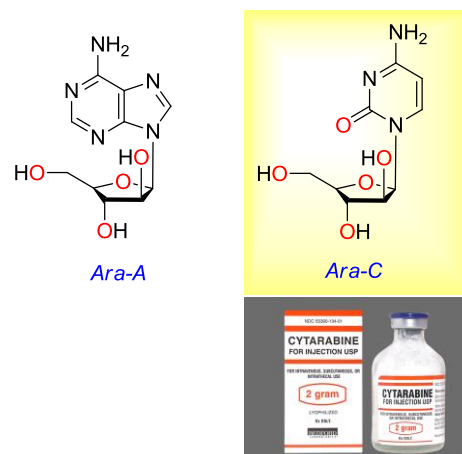


Figura 1. Los primeros fármacos derivados de un producto natural de origen marino.

La industria farmacéutica le debe mucho a los productos naturales que proceden de plantas terrestres y de microorganismos ya que han sido una importante fuente de fármacos. Ejemplos clásicos son la morfina de las amapolas, los glicósidos cardiotónicos de la dedalera y la penicilina de los hongos. En la actualidad siguen siendo una de las fuentes más importantes, como lo demuestra el hecho de que más del 60% de los nuevas entidades químicas aprobadas por las autoridades sanitarias en el período comprendido entre 1981-2010 tienen alguna relación estructural con la de un producto natural.^{2,3,4}

En el caso particular de los productos naturales marinos, su estudio tuvo que esperar por el desarrollo tanto de las técnicas de recolección de organismos, como las cromatográficas y de elucidación estructural. A pesar de ello, a finales de los años 50 la búsqueda de fármacos de procedencia marina ya había atraído algún interés. A principios de 1951, Werner Bergmann publicó tres artículos^{5,6,7} sobre tres arabino- y ribopentosilnucleósidos inusuales aislados de unas esponjas recolectadas en Florida. Estos compuestos llevaron al descubrimiento de los fármacos Ara-A (Vidarabina) y Ara-C (Citarabina), dos nucleósidos con propiedades anticancerosas que han sido usados clínicamente durante décadas (ver Figura 1).

El papel de los productos naturales marinos en la búsqueda de compuestos con aplicaciones farmacológicas ha sufrido muchos cambios en los pasados 40 años. Aunque desde mediados de los años 90 se ha producido un declive en el interés de las compañías farmacéuticas por ellos, sin embargo todavía existen

¹ Freudenthal, H. D. *Transactions of the Drugs from the Sea Symposium, University of Rhode Island, 27–29 August 1967*, 1–297. Marine Technology Society, Washington, DC, **1968**.

² Li, J.W.-H., Vederas, J. C. *Science* **2009**, 325 161.

³ Newman D. J., Cragg G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311.

⁴ Newman D. J., Cragg G. M. in *Marine Anticancer Compounds in the Era of Targeted therapies*. 1st Ed. Ed. Chapner, B. Permanyer Publications, Barcelona, **2008**.

⁵ Bergmann W., Feeney R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, 16, 981.

⁶ Bergmann W., Burke D. C. *J. Org. Chem.* **1956**, 22, 226.

⁷ Bergmann W., Stempfen M. F. *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 1575.

grupos de investigación académicos emprendedores, la mayoría asociados con la industria, que continúan y persisten en este campo. Además, en los últimos cinco años en el campo de los productos marinos se puede apreciar un cierto renacimiento, gracias al desarrollo de nuevas metodologías analíticas, espectroscópicas y de los denominados ensayos de alta producción (*high-throughput screening*)^{8,9} que junto con la decadencia de algunas técnicas prometedoras como la química combinatoria, ha logrado impulsar de nuevo a esta disciplina.

El primer compuesto de origen marino comercializado que se utiliza con fines farmacológicos fue ω -conotoxina MVIIA (Ziconotide), un péptido aislado de un caracol marino de aguas tropicales que fue aprobado en 2004 para el tratamiento de dolor crónico en los EE.UU. El segundo compuesto fue el antitumoral desarrollado por la empresa española Pharmamar ecteinascidina-743, (ET-743/Yondelis®/Trabectedina). Aislado de un tunicado tropical fue aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en octubre de 2007 para el tratamiento de cáncer de tejido blando. El último compuesto que se ha incorporado a la cartera de productos marinos como fármacos es el mesilato de eribulina del que se hablará más extensamente en esta introducción. Además existen en la actualidad otros muchos compuestos que se encuentran en diferentes fases clínicas I-III en EEUU y/o Europa y cuyo estado actual de desarrollo se muestra en la Tabla 1.

La mayor dificultad que encuentra el desarrollo de compuestos naturales de origen marino como fármacos radica en el problema de suministro, es decir, en la obtención de la suficiente cantidad de producto que permita realizar los ensayos farmacológicos de una manera continuada. Por ejemplo, las esponjas marinas, que son la fuente de muchos compuestos bioactivos tales como discodidermólido y hemiasterlina, son metazoos muy primitivos que viven exclusivamente en hábitats marinos y que la obtención de los compuestos de interés a partir de su cultivo en cautividad se ve dificultada debido a la necesidad de la presencia de una fauna microbiana asociada para que los produzcan. Por esta razón, los compuestos de interés deben de ser extraídos y purificados de los especímenes en su medio natural que en el caso de que sean recolectados mediante buceo en aguas muy profundas requieren la ayuda de sumergibles provistos de un brazo robótico que encarece todavía más dichas recolecciones. Por ello, el desarrollo de los sistemas de acuicultura de ciertos invertebrados marinos sería crucial como uno de los métodos para intentar de solventar los problemas de suministro.¹⁰

En esta introducción repasaremos la historia de los casos mas ilustrativos.

ω -Conotoxina MVIIA

Después de dos décadas de investigación, la ω -conotoxina (MVIIA, Ziconotide), obtenido en la actualidad por métodos sintéticos, se ha convertido, como hemos mencionado antes, en el primer fármaco de origen marino que fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. para el tratamiento de dolor crónico. El veneno del caracol-cono (género *Conus*), también llamado cazador de peces, contiene una variedad de péptidos tóxicos denominados conotoxinas, que actúan sinérgicamente para inmovilizar a su presa atacando su sistema neuromuscular.^{11,12}

⁸ Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nature Rev. Drug Discovery* **2004**, 4, 206.

⁹ Jarvis, L. M. *Chem. Engin. News* **2007**, 85, 22.

¹⁰ Mendola, D. *Drugs from the Sea*. Ed. Fusetani, N. pp. 120-133, Kargel, Basilea, **2000**.

¹¹ Olivera, B. M. *Science* **1985**, 230, 1338.

¹² Terlau, H., Olivera, B. M. *Physiol. Rev.* **2004**, 84, 41.

La ω -conotoxina MVIIA, aislada de la especie *Conus magnus* (ver Figura 2), ha sido un ejemplo excepcional de iniciativa del desarrollo de un fármaco para el tratamiento del dolor agudo y crónico. Fue originalmente descubierto por el grupo de Olivera de la Universidad de Utah, usando un bioensayo que medía el comportamiento de temblor en ratón después de que se le administrara el compuesto por medio de una inyección en el cerebro.¹¹ Es un péptido lineal de naturaleza policatiónica, formado por veinticinco

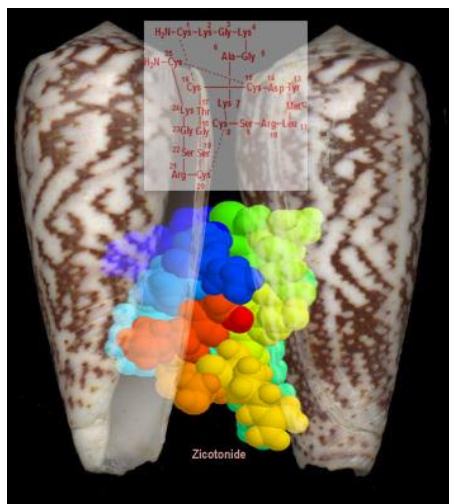


Figura 2. ω -Conotoxina MVIIA de *Conus magnus*

aminoácidos, de los cuáles seis son cisteínas que están unidas por tres puentes disulfuro que lo estabilizan, originando una estructura tridimensional bien definida.^{13,14,15} Su primera síntesis total fue publicada en 1987¹⁶. Este compuesto inhibe potencialmente la conducción de las señales nerviosas (K_i de 0.5 μ M),¹⁷ bloqueando específicamente los canales de calcio de tipo N (NVSCC) sensibles al voltaje. Estos canales se encuentran exclusivamente en las neuronas presinápticas que se localizan en la lámina superficial de la espina dorsal y tienen un papel fundamental en la señal del dolor.^{18,19} La ω -conotoxina MVIIA presenta una inhibición muy efectiva hacia dichos canales NVSCC, mostrando un valor de K_d de 9pM,²⁰ uniéndose a ellos para formar una estructura doblada.^{21,22}

Los buenos resultados de su actividad analgésica, ya que era más potente ($ED_{50}=49$ pM) que la morfina ($ED_{50}=2.1$ nM)²³ en ratones con dolor post-operatorio, lo impulsaron a entrar en los ensayos clínicos en EE.UU. y Europa para el tratamiento de dolor severo o crónico.²⁴ El 22 de diciembre de 2004 la compañía farmacéutica Elan obtuvo la aprobación de la FDA para su uso como analgésico inyectable intramedular. Dos meses más tarde la EMEA lo autorizó para su uso en casos de dolor crónico en pacientes que requirieran un analgésico inyectable.²⁵ El desarrollo sintético a nivel comercial de ω -conotoxina MVIIA fue realizado por la compañía Neurex, una filial de la empresa farmacéutica Elan,²⁶ que lo comercializó bajo el nombre de Prialt.® La aprobación de la forma sintética de la ω -conotoxina MVIIA ha impulsado la continuación de los estudios²⁷ sobre otras conotoxinas²⁸ con posible potencial terapéutico y clínico.²⁹

¹³ Olivera, B. M., Miljanich, G. P., Ramachandran, J., Adams, M. E. *Ann. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 823.

¹⁴ Chung D., Gaur S., Bell J. R., Ramachandran J., Nadasdi L. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, 46, 320.

¹⁵ Price-Carter, M., Hull, M. S., Goldenberg, D. P. *Biochemistry* **1998**, 37, 9851.

¹⁶ Menzler S.; Bikker J.A.; Horwell D.C. *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 7619.

¹⁷ Yeager, R. E., Yoshikami, D., Rivier, J., Cruz, L. J., Miljanich, G. P. *J. Neurosci.* **1987**, 7, 2390.

¹⁸ Gohil, K., Bell J. R., Ramachandran, J. Miljanich, G. P. *Brain Res.* **1994**, 653, 258.

¹⁹ Bowersox S., Gadbois T., Singht T., Petrus M., Wang Y-X., Luther R. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, 279, 1243.

²⁰ Kristipati R., Nadasdi L., Tarczy-Hormoch K., Lau K., Miljanich G. P., Ramachandran, J., Bell, J. R. *Mol. Cell. Neurosci.* **1994**, 5, 219.

²¹ Atkinson R. A., Kieffer B., Dejaegere A., Sirockin, F., Lefevre, J. F. *Biochemistry* **2000**, 39, 3908.

²² Kim J. I., Takahashi M., Ohtake A., Wakamiya A., Sato K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 206, 449.

²³ Wang Y. X., Pettus, M., Gao D., Phillips C., Scott Bowersox S. *Pain* **2000**, 84, 151.

²⁴ Miljanich G. P. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 3029.

²⁵ Garber K. *Nature Biotech.* **2005**, 23, 399.

²⁶ Jones R. M., Cartier G. E., McIntosh J. M., Bulaj G., Farra V E., Olivera B.M. 1996-2000 *Exp. Opin. Ther. Patents* **2001**, 11, 603.

²⁷ Pope J. E., Deer T. R. *Expert Opin Pharmacother*, **2013**, 14, 957.

²⁸ Bernáldez J.; Román-González S. A.; Martínez O.; Jiménez S.; Vivas O.; Arenas I.; Corzo G.; Arreguín R.; García D. E.; Possani L. D.; Licea A. *Mar Drugs*. **2013**, 11, 1188.

²⁹ Heading C. E. *J. Drugs* **2004**, 7, 1011.

Tabla 1. Productos naturales marinos con actividad antitumoral.

COMPUESTOS	ORGANISMO	TIPO DE COMPUESTO	MODELO EXPERIMENTAL	MECANISMO DE ACCIÓN	PAIS	Ref
Aptamina	Esponja	Alcaloide	Osteosarcoma	Inducción del gen p21 e inhibición del ciclo celular G2/M	Indonesia, Japón	30
Argosterol	Esponja	Esteroides	Expresión celular de MRP1	[¹²⁵ I]-ácido agosterol A unido a MPR1 retirado por ICL7 principales mutaciones	Japón	31
Sales de alquilpiridonio	Esponja	Alcaloide	Adenocarcinoma	Inducción de apoptosis y reducción de la adhesión celular	Italia, Eslovenia	32
Bastadina 6	Esponja	Alcaloide	Líneas de células de leucemia y carcinoma epidérmico	Inhibición angiogénica <i>in vitro</i> y <i>in vivo</i> apoptosis	Japón	33
Cortistatina A	Esponja	Alcaloide	Líneas celulares normales y cancerígenas	Inhibición selectiva de angiogénesis	Japón, Indonesia	34
13-Deoxitedanólido	Esponja	Macrólido	Uniones de ribosomas y síntesis de polipéptidos	Unión al ribosoma 80S y a la subunidad 60S, inhibiendo el alargamiento de polipéptidos	Japón	35
Dictiostatin-1	Esponja	Macrólido	Líneas celulares de ovario adenocarcinoma	Uniones tubulares, unión al mismo lugar que los toxoides y efectos antiproliferativos comparables con el discodermólido	EEUU	36
Dideoxipetrosinol A	Esponja	Ácido graso poliácetilénico	Leucemia monocítica	Inducción Cdk inhibidor p16 de la expresión y baja regulación de pRB	Corea del Sur	37
Discodermólido	Esponja	Policétido	Fotoafinidad marcando las células tumorales Líneas celulares tumorales de colon, mama y cervicales	Unión a los residuos de aminoácidos 305-359 en el lazo de β -tubulina Inhibición de hipoxia inducida factor 1 α Inducción del aceleramiento del envejecimiento de células	EEUU, España	38, 39, 40

³⁰ Aoki S., Kong D., Suna H., Sowa Y., Sakai T., Setiawan A., Kobayashi M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 342, 101.

³¹ Ren X.Q., Furukawa T., Yamamoto M., Aoki S., Kobayashi M., Nakagawa M., Akiyama S. *J. Biochem.* **2006**, 140, 313.

³² Paleari L., Trombino S., Falugi C., Gallus L., Carlone S., Angelini C., Sepcic K., Turk T., Faimali M., Noonan D. *Int. J. Oncol.* **2006**, 29, 1381.

³³ Aoki S., Cho S., Ono M., Kuwano T., Nakao S., Kuwano M., Nakagawa S., Gao J., Mayumi T., Shibuya M. *Anticancer Drugs* **2006**, 17, 269.

³⁴ Aoki S., Watanabe Y., Sanagawa M., Setiawan A., Kotoku N., Kobayashi M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3148.

³⁵ Nishimura S., Matsunaga S., Yoshida M., Hirota H., Yokoyama N., Fusetani N. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 449.

³⁶ Madiraju C., Edler M.C., Hamel E., Raccor B.S., Balachandran R., Zhu G., Giuliano, A. K., Vogt, A., Shin, Y., Fournier, J.H., Fukui, Y., Bückner, A. M., Curran, D. C., Day, B. W., *Biochemistry* **2005**, 44, 15053.

³⁷ Park C., Kim G. Y., Kim G.D., Lee W.H., Cheong J.H., Kim N.D. Bae S., Jung J. H., Choi Y. H. *Oncol. Rep.* **2006**, 16, 171.

³⁸ Xia S., Kenesky C. S., Rucker P.V., Smith III A.B., Orr G.A., Horwitz S.B. *Biochemistry* **2006**, 45, 11762.

³⁹ Escuin D., Kline E. R., Giannakakou P. *Cancer. Res.* **2005**, 65, 9021.

⁴⁰ Klein L. E., Freeze B. S., Smith III A. B., Horwitz S.B. *Cell. Cycle* **2005**, 4, 501.

Tabla 1: Productos naturales marinos con actividad antitumoral (continuación).

COMPUESTOS	ORGANISMO	TIPO DE COMPUESTO	MODELO EXPERIMENTAL	MECANISMO DE ACCIÓN	PAIS	Ref
Halocondrina B	Esponja	Macrólido	Líneas celulares de cáncer de mama	Supresión de los microtúbulos dinámicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	EEUU	41
Hemiasterlina	Esponja	Tripéptido	Experimentos moleculares	Uniones específicas de β -tubulina	EEUU	42
Ircinina-1	Esponja	Sesquiterpeno	Líneas celulares de melanoma	Fase de inhibición G-1 e inducción de la apoptosis	Corea del Sur	43
Jaspakinolide	Esponja	Depsipéptido	Líneas celulares de mama y de pulmón	Aumento de la movilidad de las células A-549 cáncer de pulmón pero no célula MCF7 cáncer de mama	Bélgica	44
Onnamida A	Esponja	Policétido	Líneas celulares de leucemia	Inhibición de la síntesis de proteínas activación de la proteína quinasa y la apoptosis	Japón	45
Pateamina A	Esponja	Macrólido	Líneas celulares de leucemia	Secuestra la hélice del RNA eF4A inhibiendo el inicio de traslación	Canadá	46
Pelorusido A	Esponja	Macrólido	Líneas celulares de mama	Efecto sinérgico con taxoides	Nueva Zelanda, EEUU	47
Psammaplina A	Esponja	Alcaloide	Líneas celulares tumorales	Activación de PPAR γ e inducción a la apoptosis	Japón	48
Estelletina A	Esponja	Triterpeno	Líneas celulares de leucemia	Inducción del estrés oxidativo y FasL-caspa-3 en la apoptosis	China	49
Estrobilininol-felixinino	Esponja	Sesquiterpeno	Líneas celulares tumorales	Inhibe el ciclo S celular y la topoisomerasa I y pol α -primasa	Corea del Sur	50
Variolina B	Esponja	Alcaloide	Líneas celulares de leucemia, colon y ovario	Inhibición de quinasa MAP e inducción de la apoptosis	Francia, Italia, España	51
Dolostatina 10 y 15	Molusco	Péptido	Panel de células tumorales	Fragmentación del ADN	Japón	52
Kahalalido F	Molusco	Depsipéptido	Líneas celulares de leucemia, colon y ovario	Proteína ErB3 y PI3K-Akt, camino de la inducción necrótica	España, Noruega	53
Lamellarina D	Molusco	Alcaloide	Líneas celulares tumorales	Apoptosis inducida por el efecto en mitocondria conc.(η M)	Francia, España	54

⁴¹ Jordan M.A., Kamath K., Manna T., Okouneva T., Miller H.P., Davis C., Littlefield B. A., Wilson L. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, 4, 1086.

⁴² Ravi M., Zask A., Rush III T.S. *Biochemistry* **2005**, 44, 15871.

⁴³ Choi H. J., Choi Y.H., Yee S.B., Im E., Jung J.H., Kim N.D. *Mol. Carcinog.* **2005**, 44, 162.

⁴⁴ Hayot C., Debeir O., Van H.P., Van D.M., Kiss R., Decaestecker C. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, 211, 30.

⁴⁵ Lee, K.H., Nishimura, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., Horinouchi, S., Yoshida, M. *Cancer Sci.* **2005**, 96, 357.

⁴⁶ Bordeleau, M.E., Cencic, R., Lindqvist, L., Oberer, M., Northcote, P., Wagner, G., Pelletier, J. *Chem. Biol.* **2006**, 13, 1287.

⁴⁷ Hamel, E., Day, B.W., Miller, J.H., Jung, M.K., Northcote, P.T., Ghosh, A.K., Curran, D. P., Cushman, M., Nicolau, K. C., Paterson, I., Sorensen, E. J. *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70, 1555.

⁴⁸ Mora, F.D., Jones, D.K., Desai, P.V., Patny, A., Avery, M.A., Feller, D.R., Smillie, T., Zhou, Y., Nagle, D. G. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 547.

⁴⁹ Liu, W.K., Cheung, F.W., Che, C.T. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 934.

⁵⁰ Jiang Y., Ahn E.Y., Ryu S.H., Kim D.K., Park J.S., Kang S.W., You S., Lee B., Jung J. H. *Oncol. Rep.* **2005**, 14, 957.

⁵¹ Simone M., Erba E., Damia G., Vikhanskaya F., Di Francesco A.M., Riccardi R., Bailly C., Cuevas C., Fernandez S. J. M., D'Incalci M. *Eur. J. Cancer* **2005**, 41, 2366.

⁵² Watanabe J., Minami M., Kobayashi M. *Anticancer. Res.* **2006**, 26, 1973.

⁵³ Janmaat M.L., Rodriguez J.A., Jimeno J., Kruyt F.A., Giaccone G. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 502.

⁵⁴ Kluza J., Gallego M.A., Loyens A., Beauvillain J.C., Sousa-Faro J.M., Cuevas C., Marchetti P., Bailly C. *Cancer Res.* **2006**, 66, 3177.

Tabla 1: Productos naturales marinos con actividad antitumoral (continuación).

COMPUESTOS	ORGANISMO	TIPO DE COMPUESTO	MODELO EXPERIMENTAL	MECANISMO DE ACCIÓN	PAIS	Ref
Aplirorina A	Molusco	Macrólido	Método de radiación mediante sincrotrón	Unión al surco hidrófilo en la molécula de actina incluyendo trimetilserina hidratada	Japón	55
Aplidina	Ascidia	Depsipéptido	Líneas celulares fibroblásticas	Oxidación y activación de la actividad fosfatasa en proteínas de bajo peso molecular	Italia España Alemania	56
			Líneas celulares de cáncer de tiroides	Citostático, bloquea la fase G1 en el ciclo celular, reducción de ciclina D1 y niveles de las proteínas cdk4 y p21.		57
			Líneas celulares de leucemia	Apoptosis promovida por la concentración de receptores marcando moléculas en el ciclo de los lípidos.		58
			Líneas celulares de cáncer de mama	JNK-dependiente en la apoptosis que afecta a la homeostasis de la glutatona, activación Rac1 GT y de MKP-1 fosfatasa		59
Ascididenin	Ascidia	Alcaloide	Unión al ADN	Mejora la unión telomérica con el ADN cuádruple Despolimerización de F-actina, inhibición de la polimerización con G-actina, unión de los subdominios de la actina 1 y 3	Francia, Bélgica EEUU	60
Bistramida A	Ascidia	Policétido				61, 62
Ectenasteidin-743 (ET-743)	Ascidia	Alcaloide isoquinolínico	Líneas celulares hepatoma, lipo-, leio-, osteo- y condrosarcoma	Regulación de genes	España	63
Fucoxantanol	Ascidia	Carotenoide	Líneas celulares de leucemia, mama, colon	Inducción de apoptosis y disminución en la proteína Bcl-2 proteína	Japón	64

⁵⁵ Hirata K., Muraoka S., Suenaga K., Kuroda T., Kato K., Tanaka H., Yamamoto M., Takata M., Yamada K., Kigoshi H. *J. Mol. Biol.* **2006**, 35, 945.

⁵⁶ Taddei M.L., Chiarugi P., Cuevas C., Ramponi G., Raugei G. *Int. J. Cancer* **2006**, 118, 2082.

⁵⁷ Bravo S. B., Garcia-Rendueles M.E., Seoane R., Dosil V., Cameselle-Teijeiro J., Lopez-Lazaro L., Zalvide J., Barreiro F., Pombo C. M., Alvarez C. V. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 7664.

⁵⁸ Gajate, C., Mollinedo, F., *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 11641.

⁵⁹ Gonzalez-Santiago L., Suarez Y., Zarich N., Muñoz-Alonso M. J., Cuadrado A, Martinez T., Goya L., Iradi A., Saez-Tormo G., Maier J.V., Moorthy A., Cato A.C., Rojas J.M., Muñoz A. *Cell Death Differ.* **2006**, 13, 1968.

⁶⁰ Guittat L., De, C.A., Rosu, F., Gabelica, V., De, P.E., Delfourne, E, Mergny, J. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1724, 375.

⁶¹ Statsuk A.V., Bai R., Baryza J.L., Verma, V.A., Hamel, E., Wender, P.A., et al. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 383.

⁶² Rizvi, S.A., Tereshko, V., Kossiakoff A.A., Kozmin, S.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3882.

⁶³ Minuzzo, M., Ceribelli, M., Pitarque-Marti, M., Borrelli, S., Erba, E., DiSilvio, A., D'Incalci, M., Mantovani, R. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 1496.

⁶⁴ Konishi I., Hosokawa M., Sashima T., Kobayashi H., Miyashita K. *Comput. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, 142, 53.

Tabla 1: Productos naturales marinos con actividad antitumoral (continuación).

COMPUESTOS	ORGANISMO	TIPO DE COMPUESTO	MODELO EXPERIMENTAL	MECANISMO DE ACCIÓN	PAIS	Ref
Ningalinas	Ascidia	Alcaloide	Líneas celulares de cáncer de mama y leucemia	Inhibición de PgP y -retroceso de la actividad MDR	EE.UU	65
Bromovulona III	Coral blando	Prostanioide	Líneas celulares de hepatocarcinoma	Estres en la apoptosis y del retículo endoplasmático, activación de caspasa-12	Taiwán	66
			Hormona resistente líneas celulares de cáncer de prótata	Apoptosis vía inducción de núcleos Fas y caspasa-8/Bid/caspasa12		67
Clavulona II	Coral blando	Prostanoide	Líneas celulares leucemia	Dificulta el ciclo G1 de la célula y la apoptosis	Taiwán	68
Cefalostatina 1	Gusano	Esterioide	Líneas celulares Jurkat	Detección de hiperfosfolirización Bcl-2 independiente de la fase M y daño en el DNA	Alemania	69
				Inducción de la apoptosis vía stress ER respuesta señalando y activando las tirosinaquinasas-4 y -9	EEUU	70
Filinopsido A	Cohombro de mar	Saponina	Líneas celulares de adenocarcinoma	Inhibición de la angiogénesis y receptor de las Kinasas tirosina	China	71

⁶⁵ Chou T.C., Guan Y., Soenen D.R., Danishefsky S.J., Boger D.L. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, 56, 379.

⁶⁶ Chiang P.C., Chien C.L., Pan S.L., Chen W.P., Teng C. M., Shen Y.C., Guh J.H J. *Hepatol.* **2005**, 43, 679.

⁶⁷ Chiang P.C., Kung F.L., Huang D.M., Li T.K., Fan J.R., Pan S.L., Shen Y.C., Guh J.H. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, 542, 22.

⁶⁸ Huang Y.C., Guh J.H., Shen Y.C., Teng C.M. *J. Biomed. Sci.* **2005**, 12, 335.

⁶⁹ Muller I.M., Dirsch V. M., Rudy A., Lopez-Anton N., Pettit G.R., Vollmar A.M. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 1684.

⁷⁰ Lopez-Anton N., Rudy A., Barth N., Schmitz M.L., Pettit G.R., Schulze-Osthoff K., Dirsch V. M., Vollmar A. M. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 33078.

⁷¹ Tong Y., Zhang X., Tian F., Yi Y., Xu Q., Li L., Tong L., Lin L., Ding J. *Int. J. Cancer* **2005**, 114, 843.

Ecteinasclidina-743

Ecteinasclidina-743 (ET-743/trabectedina) (ver Figura 3) representa un hito en el desarrollo de los fármacos derivados de organismos marinos. Después de 40 años de su aislamiento y 20 años después de la publicación de su estructura, ha llegado a ser el primer fármaco anticanceroso de origen marino que ha llegado al mercado. Aunque en 1969 se publicó que los extractos del tunicado *Ecteinasclidia turbinata* mostraban una importante actividad antitumoral,⁷² el laborioso aislamiento del compuesto activo tuvo que esperar casi dos décadas. Finalmente en 1990, Rinehart⁷³ y Wright⁷⁴ publicaron de forma independiente las estructuras de los alcaloides aislados de este tunicado y les denominaron ecteinasclidinas.

La estructura del compuesto más abundante y activo, la ET-743, y la de su análogo *N*-dimetilado, la ET-729 (Figura 3), está constituida por tres anillos de isoquinolina, que está relacionada, a su vez, con la del alcaloide isoquinolínico saframicina A, aislado de especies *Streptomyces*. La conexión del tercer anillo tetrahydroisoquinolínico a la base de la estructura, mediante un puente de tioéter, completa los diez miembros de la lactona, que es una parte muy característica de las ecteinasclidinas.

Primero se estudió su actividad contra células de leucemia L1210 ($IC_{50}=0.5$ ng/mL)⁷³ y más tarde se encontró que poseía poderosos efectos antitumorales *in vivo* en varios modelos linfoma de ratón P-388, melanoma B16, sarcoma ovárico M5076, Lewis y LX-1, carcinoma de pulmón humano y carcinoma humano de mama MX-1.^{73,75}

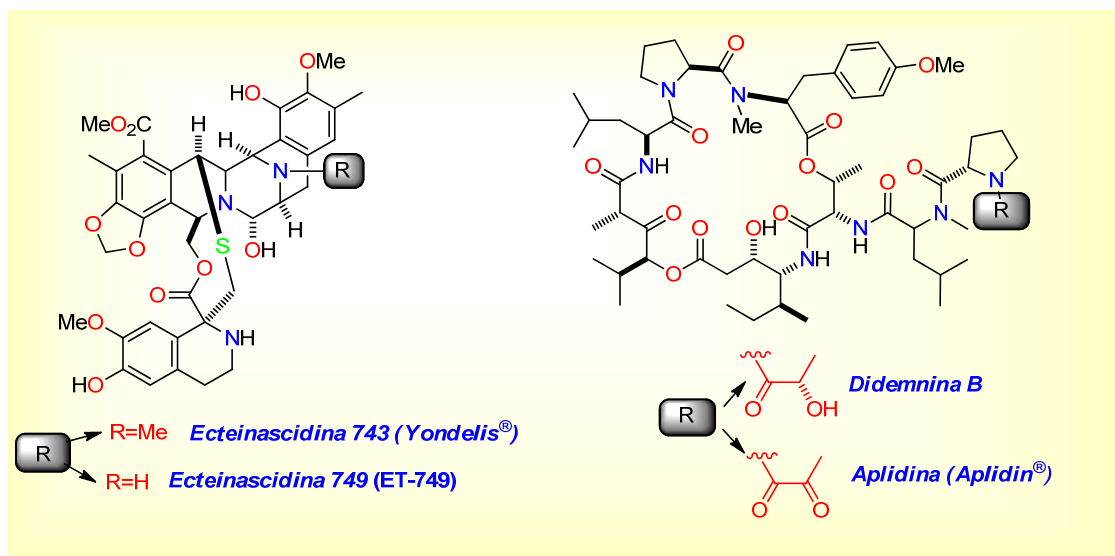


Figura 3. Estructuras de ET-743, ET-749, aplidina y didemnina B procedentes de tunicados.

Un grave problema que presentó el desarrollo de ET-743 fue el de su suministro, ya que la concentración presente en el tunicado es muy baja. Aunque su síntesis total se completó en 1996, el bajo rendimiento

⁷² Sigel, M. M., Wellham, L.L., Lichter, W., Dudeck, L.E., Gargus, J.L., Lucas, L.H. in *Food-Drugs from the Sea: Proceedings* (ed. Youngken H. W. Jr) 281. Marine Technology Society, Washington, DC, 1969.

⁷³ Rinehart K. L., Kenneh L., Holt T. G., Fregeau N. L., Stroth J. G., Keifer P. A., Sun F., Li I. H., Martin D. G. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4512.

⁷⁴ Wright A. E., Forleo D. A., Guawardana G. P., Gunasekera S. P., Koehn F. E., McConnell O. J. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4508.

⁷⁵ Sakai R., Rinehart K. L., Guan Y., Wang A. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 11456.

obtenido, aproximadamente del 0.75%, hacía imposible el suministro de la cantidad de compuesto necesaria para los ensayos clínicos *in vitro* e *in vivo*.^{76,77}

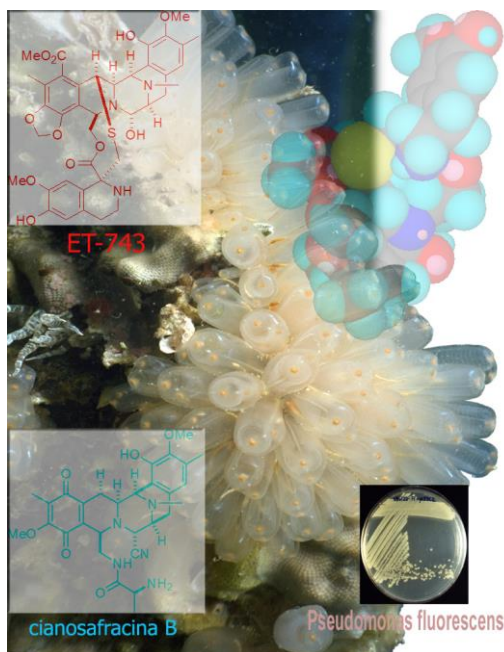


Figura 4. Estructuras de la ET-743 y de cianosafracina B. Fotografía del tunicado *Ecteinascidia turbinata* y de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* de los que se aíslan.

Por ello, se planteó una segunda aproximación mediante acuicultura del tunicado a través de su cultivo controlado, pero los porcentajes de producción eran muy variables.

Finalmente, Pharmamar consiguió desarrollar una ruta semi-sintética a gran escala de ET-743 partiendo de la cianosafracina B, un antibiótico que se puede obtener en cantidades de kilogramos a través de la fermentación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (ver Figura 4).⁷⁸

El mecanismo de acción del ET-743 consiste en una modificación covalente de ADN mediante la alquilación específica de la guanina en la posición N2, actuando de forma similar al de cualquier agente alquilante. Pero a diferencia de éste, el ET-743 es selectivo para las secuencias ricas en GC y forma un aducto reversible que provoca la desnaturalización del ADN,⁷⁹ induciendo una curva en la hélice dirigida hacia el surco mayor.^{80,81} Esto explica parcialmente la potencia del ET-743 comparada con la de otros agentes alquilantes como safracina A o la antramycin, que tienen grupos más pequeños en el anillo C. ET-743 también afecta a la transición y acoplamiento de la reparación y excisión de nucleótidos

además de la muerte celular.^{81,82}

ET-743, comercializado por Pharmamar bajo el nombre Yondelis®, fue aprobado para el tratamiento de sarcomas refractarios de tejido blando por la EMEA en Julio 2007. En septiembre de 2009, esta misma comisión lo aprobó para el tratamiento de cáncer de ovario recurrente *cis*-platinosensible. La patente de ET-743 en EE.UU. está bajo la propiedad de Johnson & Johnson/OrthoBiotech para el desarrollo y comercialización de éste fármaco en ese país.⁸³

También se han realizado ensayos clínicos en fase II para el sarcoma de Ewing y tejidos blando,⁸⁴ cáncer colorectal,⁸⁵ cáncer pretratado de mama,⁸⁶ cáncer de ovario⁸⁷ y otros sarcomas.^{88,89,90} Los estudios demuestran

⁷⁶ Corey E. J., Gin D. Y., Kania R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9202.

⁷⁷ Martinez E. J., Corey E. J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 993.

⁷⁸ Cuevas C., Pérez M., Martín M. J., Chicharro J. L., Fernández-Rivas C., Flores M., Francesch A., Gallego P., Zarzuelo M., De la Calle F., García J., Polanco C., Rodríguez I., Manzanares, I. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2545.

⁷⁹ Pommier Y., Kohlhaagen G., Bailly C., Waring M., Mazumder A., Kohn K.W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13303.

⁸⁰ Zewail-Foote M., Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2493.

⁸¹ Zewail-Foote M., Ven-Shun L., Kohn H., Bearss D., Guzman M., Hurley L. H. *Chemistry & Biology*. **2001**, *8*, 1033.

⁸² Takebayashi Y., Pourquier P., Zimonjic D. B., Nakayama K., Emmert S., Ueda T., Urasaki Y., Kanzaki A., Akiyama S., Popescu N., Kraemer K. H., Pommier Y. *Nature Med.* **2001**, *7*, 961.

⁸³ Aune G. J., Furuta T., Pommier Y. *Anticancer Drugs* **2002**, *13*, 545.

⁸⁴ Di Leo P. *Ann. Oncol.* **2006**, *17*, 167.

⁸⁵ Ballmunt J., Paz-Ares L., Cuello M., Cocora F. L., Albiol S., Guillem V., Gallardo E., Carlos J., Mendez P., de la Cruz J. J., Taron M., Rosell R., Baselga J. *Clin. Colorectal Cancer* **2007**, *6*, 522.

⁸⁶ Zelek L., Yovine A., Brain E., Turpin F., Taamma A., Riofrio M., Spielmann M., Jimenez J., Misset J. L. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1610.

que ET-743 tiene una importante actividad antitumoral⁹¹ en tumores sólidos, en particular cáncer de mama y de riñón, y sarcomas de tejidos blandos, particularmente osteosarcomas, mesotelioma, leiomiomasarcoma y liposarcoma.^{92,93,94} Estudios preclínicos de ET-743 en combinación con tratamientos doxorubicina,⁹⁵ paclitaxel,⁹⁶ o irinotecan⁹⁷ contra sarcomas, revelaron efectos sinérgicos entre ambos fármacos de manera semejante en los estudios de fase II con doxorubicina.⁹⁵

Los logros alcanzados en 2009 permitieron distribuir Yondelis® a partir del año 2010 como fármaco en Europa Occidental a través de la empresa española PharmaMar, en Escandinavia y Europa Oriental a través Swedish Orphan International y en Grecia, Chipre y los Balcanes por medio de Genesis Pharma. En febrero de ese mismo año, Yondelis® recibió ocho nuevas aprobaciones fuera de la Unión Europea, concretamente en Bolivia, Paraguay, Tailandia, Malasia, Curazao, Azerbaiyán y Kazajistán, para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos. Además en Kazajistán, recibió la aprobación para el tratamiento de cáncer de ovario recidivante a *cis*-platino. Con estas nuevas autorizaciones, Yondelis®, ha sido aprobado, además de los 31 países europeos, en 21 países de fuera de Europa. Diez de estas autorizaciones de comercialización implican la combinación de Yondelis® con Caelyx® (hidrocloruro de doxorubicina) para el tratamiento de cáncer de ovario recurrente platino-sensible en Baréin, Costa Rica, República Dominicana, Jamaica, Jordania, Nepal, Omán, Panamá, Qatar y Vietnam. Además, en Baréin, República Dominicana, Jordania y Nepal, Yondelis® ha sido aprobado para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos⁹⁸ (STS). Tras esta última decisión, Yondelis® está aprobado en un total de 73 países, 30 de ellos pertenecientes al Espacio Económico Europeo (EEE).

Didemnina B y aplidina

ET-743 no fue el único anticanceroso potente aislado de ascidias. Existen otros dos compuestos muy relacionados entre ellos y que fueron encontrados en diferentes organismos: didemnina B,^{92,99,100,101} aislada de *Trididemnum solidum* por el grupo del profesor Rinehart¹⁰² y la aplidina, obtenida de *Aplidium albicans* recolectada en el Mediterráneo (Figura 3). Aunque sus estructuras son muy similares, sin embargo sus patrones preclínicos son muy diferentes.

⁸⁷ Sessa C., Poveda A., Vergote I., Tjulandin, S., Kong, B., Roy, M., Chan, S., Filipczyk-Cisarz, E., Hagberg, H., Kaye, S. B., Colombo, N., Lebedinski C., Parekh T., Gómez J., Park Y. C., Alfaro V., Monk B.J. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1867.

⁸⁸ Yovine A., Yovine A., Riofrio M., Blay J. Y., Brain E., Alexandre J., Kahatt C., Taamma A., Jimeno J., Martin C., Salhi Y., Cvitkovic E., Misse J. L. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 890.

⁸⁹ Jimeno J., Maki R. G., Casali P., Faircloth G., Martinez N., Nieto A., Cañigüeral S., Rinehart, K. *Curr. Op. Orthopaed.* **2003**, *14*, 419.

⁹⁰ Schroeder B.A., Rodler E. T., Loggers E. T., Pollack S. M., Jones R. L. *Med Oncol.* **2013**, *30*, 501.

⁹¹ D'Incalci M., Frapolli R., Germano G., Allavena P. *Oncotarget* **2013**, *4*, 496.

⁹² Jimeno J., López-M. J. A., Ruiz-Casado A., Izquierdo M. A., Scheuer P. J., Rinehart K. *Anticancer Drugs* **2004**, *15*, 321.

⁹³ Ryan D. P. *Oncologist* **2002**, *7*, 531.

⁹⁴ Blay J. Y., Lécésne, A., Verwel J., Scurr, M., Seynaeve C., Bonvalot S., Hogendoorn P., Jimeno J., Evrard V., van Glabbeke M., Judson, L. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 1327.

⁹⁵ Meco D., Colombo T., Ubezio, P., Zucchetti M., Riccardi A., Faircloth G., Jimeno J., D'Incalci M., Riccardi R. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *52*, 131.

⁹⁶ Takahashi N., Li W. W., Banerjee D., Scotto K. W., Bertino J. R. *Clin. Canc. Res.* **2001**, *7*, 3251.

⁹⁷ Riccardi A., Meco D., Ubezio P., Mazzarella G., Marabese M., Faircloth G., Jimeno J., D'Incalci M., Riccardi R. *Anticancer Drugs* **2005**, *16*, 811.

⁹⁸ Rafia R., Simpson E., Stevenson M., Papaioannou D. *Pharmacoeconomics*, **2013**. Doi: 10.1007/s40273-013-0044-7.

⁹⁹ Chun H. G., Davies B., Hoth D., Suffness M., Plowman J., Flora K., Grieshaber C., Leyland-Jones B. G. *Invest. New Drugs* **1986**, *4*, 279.

¹⁰⁰ Vera M. D., Joulle M. M. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 102.

¹⁰¹ Rinehart K. L. *Antitumor Med. Res. Rev.* **2003**, *1*, 1.

¹⁰² Rinehart K. L., Gloer J. B., Cook J. C., Mizsak A., Scahill T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1857.

La estructura original de didemnina B, publicada en 1981,¹⁰² fue revisada en 1987 cuando se completó su síntesis total,¹⁰³ confirmándose su estructura final en 1988 mediante un estudio de rayos-X de monocristal. Aunque mostró actividad citotóxica en ensayos *in vivo* en concentraciones nanomolares,^{92,99,100,101,104} los ensayos clínicos se interrumpieron a mediados de los años noventa.

Un análogo muy similar denominado aplidina (deshidrodidemnina B), resultó ser más prometedor. Aplidina es un compuesto patentado por Rinehart en 1991¹⁰⁵ y se aísla del tunicado del Mediterráneo *Aplidium albicans*. Difiere de didemnina B en que el grupo lactilo unido al N de la prolina terminal es sustituido por un grupo piruvilo (Figura 3). Mostró niveles similares de actividad antitumoral¹⁰⁶ que didemnina B frente a cultivos de células tumorales.¹⁰⁷ Los análisis clínicos en fase II¹⁰⁸ de aplidina continúan en la actualidad e incluyen metástasis de melanoma, múltiple mieloma, linfoma no-Hodgkin, leucemia linfoblástica, cáncer de próstata y cáncer de vejiga. Nuevamente, uno de los principales obstáculos de su desarrollo es el problema del suministro. Su obtención mediante su aislamiento a partir del tunicado es muy limitada debido a las dificultades en su recolección, ya que estos organismos están muy dispersos, y porque su cultivo es inviable. En la actualidad, el abastecimiento depende únicamente de la síntesis total. Por ello se continúa sintetizando nuevos derivados¹⁰⁹ y estudiando su citotoxicidad.¹¹⁰

Otros productos naturales marinos con actividad antimitótica

Otros productos naturales marinos que derivan de esponjas, moluscos, briaranos y cianobacterias muestran potentes propiedades antimicóticas. Actúan impidiendo el crecimiento celular bloqueando la proteína tubulina de una forma similar al de otros agentes anticancerosos como la vincristina, la vinblastina y el paclitaxel. Aunque ninguno ha sido aprobado como fármaco hasta la fecha, están siendo de gran ayuda para estudiar la compleja interacción entre las proteínas microtubulares y los compuestos antimitóticos. A continuación se muestran ejemplos de estos productos naturales que pueden modificar la dinámica de la tubulina.

Hemiasterlina/HTI-286

La hemiasterlina es un tripéptido antimitótico cuyo aislamiento de la esponja *Hemiasterella minor* fue publicado en 1994 por Kashman y colaboradores (Figura 5).¹¹¹ El estudio inicial mostró que es muy citotóxica, con un valor IC₅₀ de 0.01 µg/mL contra la línea celular de leucemia P-388.¹¹¹ Sus análogos, las hemiasterlinas A y B (Figura 5), fueron aisladas por Andersen y colaboradores de las esponjas de los géneros *Auleta* y

¹⁰³ Rinehart K. L., Kishore V., Nagarajan S., Lake R. J., Gloer J. B., Bozich F. A., Ming Li K., Maleczka Jr R. E., Todsén W. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6846.

¹⁰⁴ Hossain M. B., Van der Helm, D.; Antel, J.; Sheldrick, G.M.; Sanduja, S.K.; Weinheimer, A. *J. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4118.

¹⁰⁵ Rinehart K. L., Lithgow-Bertelloni A. M., WO9104985 (A1), **2004**, 1405.

¹⁰⁶ Mateos M. V., Cibeira M. T., Richardson P. G., Prosper F., Oriol A., de la Rubia J., Lahuerta J. J., García-Sanz R., Extremera S., Szyldergemajn S., Corrado C., Singer H., Mitsiades C. S., Anderson K. C., Bladé J., San Miguel J. *Clin Cancer Res.* **2010**, *16*, 3260.

¹⁰⁷ Nuijen, B. *Anticancer Drugs* **2000**, *11*, 795.

¹⁰⁸ Le Tourneau C., Faivre S., Ciruelos E., Domínguez M. J., López-Martín J. A., Izquierdo M. A., Jimeno J., Raymond E. *Am. J. Clin. Oncol.* **2010**, *33*, 132.

¹⁰⁹ Henne W. A., Kularatne S. A., Ayala-López W., Doorneweerd D. D., Stinnette T. W., Lu Y., Low P. S. *Bioorg Med Chem Lett.* **2012**, *22*, 709.

¹¹⁰ Morande P. E., Zanetti S. R., Borge M., Nannini P., Jancic C., Bezares R. F., Bitsmans A., González M., Rodríguez A. L., Galmarini C. M., Gamberale R., Giordano M. *Invest New Drugs* **2012**, *30*, 1830.

¹¹¹ Talpir R., Benayahu Y., Kashman Y., Pannell L., Schleyer M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4453.

Cimbastella, mostrando incluso mayores actividades.¹¹² Todas las hemiasterlinas mostraron ser citotóxicas en el intervalo nanomolar contra una variedad de células humanas y de ratón. En 1996 se publicó el análisis estructural de rayos X de monocristal del ester metílico de hemiasterlina.¹¹³ Un cuarto análogo, la hemiasterlina C, fue descrito en 1999.¹¹⁴

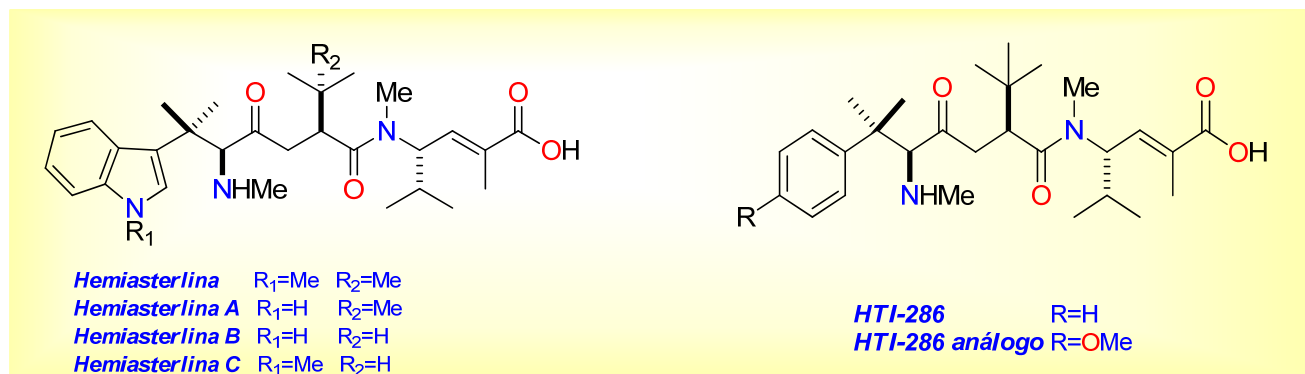


Figura 5. Estructura de hemiasterlina y la de sus análogos naturales y sintéticos.

Se han realizado multitud de estudios farmacológicos de hemiasterlina^{111,112,113,115} que mostraron que su mecanismo de acción es muy parecido a otros tipos de agentes quimioterapéuticos tales como paclitaxel o vinblastina.¹¹⁶ Hemiasterlina A mostró interferencia con la formación del eje mitótico a bajas concentraciones con mayor eficacia que paclitaxel o vinblastina.^{116,117}

Derivados sintéticos de las hemiasterlinas^{118,119} con mayor actividad son conocidos como HTI-286 (SPA-110/taltobulin, Figura 5) en el que el grupo *N*-metiltripatófano,¹¹³ es sustituido por un grupo fenilo y el análogo de HTI-286 que es sustituido por un *p*-metoxilo.¹¹⁴ Estos resultados demuestran que elementos estructurales como el grupo geminal β,β -dimetilo y el *N*-metilo en el aminoácido *N*-terminal por un lado, y el grupo *iso*-propilo y doble enlace del γ -aminoácido C-terminal por otro, son esenciales para la actividad. Por el contrario, la cadena lateral arilo en el aminoácido *N*-terminal no es un fragmento estructural fundamental ya que puede ser remplazada sintéticamente por grupos alquilo (por ejemplo *terc*-butilo), sin perder su potente actividad.^{120,121,122,123,124}

¹¹² Coleman J. E., de Silva E. D., Kong, F., Andersen R. J., Allen T. M. *Tetrahedron* **1995**, 51, 10653.

¹¹³ Coleman J. E., Patrick B. O., Andersen R. J., Rettig, S. J. *Acta Cryst. Sec. C* **1996**, 52, 1525.

¹¹⁴ Gamble W. R., Durso N. A., Fuller R. W., Westergaard C. K., Johnson T. R., Sackett D. L., Hamel E., Cardellina II J. H., Boyd M. R. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1611.

¹¹⁵ Bai R., Durso N. A., Sackett D. L., Hamel E. *Biochemistry* **1999**, 38, 14302.

¹¹⁶ Anderson H. J., Coleman J. E., Andersen R. J., Roberge, M. *Chemother. Pharmacol.* **1997**, 39, 223.

¹¹⁷ Kuznetsov G., TenDyke K., Towle M. J., Cheng H., Liu J., Marsh J. P., Schiller S. E., Spyvee M. R., Yang H., Seletsky B. M., Shaffer C. J., Marceau V., Yao Y., Suh E. M., Campagna S., Fang F. G., Kowalczyk J. J., Littlefield B. A. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8, 2852.

¹¹⁸ Simoni D., Lee R. M., Durrant D. E., Chi N. W., Baruchello R., Rondanin R., Rullo C., Marchetti P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 3431.

¹¹⁹ Hsu L. C., Durrant D. E., Huang C. C., Chi N. W., Baruchello R., Rondanin R., Rullo C., Marchetti P., Grisolia G., Simoni D., Lee R. M. *Invest. New Drugs* **2012**, 30, 1379.

¹²⁰ Nieman J. A., Coleman J. E., Wallace D. J., Piers E., Lim L. Y., Roberge M., Andersen R. J. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 183.

¹²¹ Zask A., Birnberg G., Cheung K., Kaplan J., Niu C., Norton E., Suayan R., Yamashita A., Cole D., Tang Z., Krishnamurthy G., Williamson R., Khafizova G., Musto S., Hernandez R., Annable T., Yang X., Discafani C., Beyer C., Greenberger L. M., Loganzo F., Ayral-Kaloustian S. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4774.

¹²² Zask A., Birnberg G., Cheung K., Kaplan J., Niu C., Norton E., Yamashita A., Beyer C., Krishnamurthy G., Greenberger L. M., Loganzo F., Ayral-Kaloustian S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4353.

Se ha comprobado que la estequiometría de HTI-286 al unirse al monómero α/β -tubulina es 1:1¹²⁵ y que dicha unión es rápida y exotérmica, al contrario que la formación de los oligómeros que es más lenta. Aunque la interrupción de la dinámica de tubulina por hemisterlina y HTI-286 ocurre a bajas concentraciones, se necesita al menos un equivalente de péptido para conseguir la despolimerización de microtúbulos de la tubulina.¹²⁶

(+)-Discodermólido

El (+)-discodermólido¹²⁷ (Figura 6) fue aislado por primera vez por el grupo de investigación de Gunasekera¹³² del Instituto Oceanográfico de Harbor Branch en Florida, de una esponja poco común de aguas profundas llamada *Discodermia dissoluta*. Esta esponja se encuentra sólo en las Bahamas a profundidades de 300 m, aunque recientes evidencias muestran que puede existir en zonas de menos profundidad.

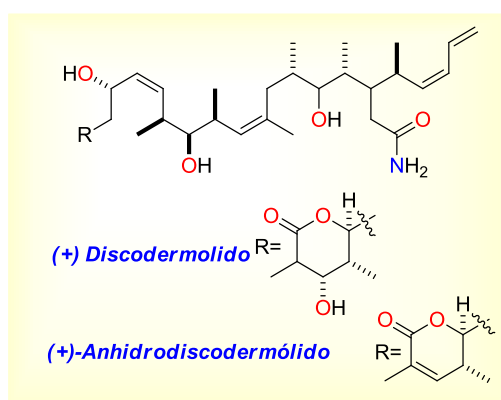


Figura 6. Estructura de discodermólido y anhidrodiscodermólido.

El discodermólido funciona como inmunosupresor^{128,129} y detiene la fase del ciclo celular G2/M en células linfáticas y no linfáticas a concentraciones nanomolares.¹³⁰ La estructura del (+)-discodermólido fue elucidada por análisis de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas,^{131,132} siendo su estereoquímica relativa determinada por difracción de rayos-X.¹³¹ Su enantiómero, (-)-discodermólido, obtenido por síntesis total,¹³³ mostró significantes diferencias en su actividad antitumoral con respecto a (+)-discodermólido. En ensayos *in vitro*, (-)-discodermólido detiene el ciclo celular a concentraciones más altas (72-135 nM) que su enantiómero natural (3-80 nM). Aunque ambos enantiómeros bloquean el ciclo celular en fase S, sus efectos no

¹²³ Yamashita A., Norton E. B., Kaplan J. A., Niu C., Loganzo F., Hernandez R., Beyer C. F., Annable T., Musto S., Discafani C., Zask A., Ayrál-Kaloustian S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5317.

¹²⁴ Niu C, Smith D., Zask A., Loganzo F., Discafani C., Beyer C., Greenberger L., Ayrál-Kaloustian S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4329.

¹²⁵ Lo M.-C., Aulabaugh A., Krishnamurthy G., Kaplan J., Zask A., Smith R. P., Ellestad G. J. *Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9898.

¹²⁶ Krishnamurthy G., Cheng W., Lo M. C., Aulabaugh A., Razinkov V., Ding W. D., Loganzo F., Zask A., Ellestad G. *Biochemistry* **2003**, *42*, 13484.

¹²⁷ Kalesse M. *Chem. Biochem.* **2000**, *1*, 171.

¹²⁸ Longley R. E., Caddigan D., Harmody D., Gunasekera M., Gunasekera S. P. *Transplantation* **1991**, *52*, 650.

¹²⁹ Longley R. E., Caddigan D., Harmody D., Gunasekera M., Gunasekera S. P. *Transplantation* **1991**, *52*, 656.

¹³⁰ Longley R. E., Gunasekera S. P., Faherty D., McLane J., Dumont F. *Ann. NY Acad. Sci.* **1993**, *696*, 94.

¹³¹ Gunasekera S. P., Gunasekera M., Longley R. E., Schulte G. K. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912.

¹³² Gunasekera S. P., Gunasekera M., Longley R. E., Schulte G. K. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1346.

¹³³ Nerenberg J. B.; Hung D. T.; Somers, P. K. and Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12621.

son mutuamente competitivos,¹³⁴ por lo que los estudios se centraron en el compuesto natural (+)-discodidermolido.¹³⁵ Debido a problemas de suministro a partir de su fuente natural, se propuso desarrollar un método sintético eficiente, apareciendo diversos métodos en los últimos años^{135,136,137} que lograron prepararlo en cantidad de gramos.^{138,139,140} Así, un grupo de Novartis llegó a preparar unos 60 g de compuesto que permitió proveer suficiente material para los ensayos clínicos.^{141,142,143,144,145}

Estudios de (+)-discodidermolido en la detección del ciclo celular mostraron que estabiliza los microtúbulos de forma más efectiva que el paclitaxel.^{146,147} Es un pobre sustrato para P-glicoproteína y es citotóxico para células con mutaciones en tubulina que le confieren resistencia al paclitaxel.¹⁴⁸ A pesar de la mutua competencia entre (+)-discodermólido y paclitaxel, ambos compuestos mostraron una fuerte actividad sinérgica en la actividad inhibitoria.^{149,150,151}

La citotoxicidad de (+)-discodermólido a concentraciones muy bajas puede observarse en la retención del ciclo celular, en la alteración de mitosis¹⁵² y de la inducción a la apoptosis,¹⁵³ y en la significativa alteración en la dinámica de los microtúbulos¹⁵⁴. Ha mostrado actividad en ensayos *in vivo* contra las células HCT-116 en ratones. Se logró la curación de cuatro de cinco ratones con una simple inyección, mediante el tratamiento combinado de (+)-anhidrodiscodermólido C (Figura 6) y bacteriológico con esporas de la bacteria *Clostridium novyi*-NT.¹⁵⁵

Aunque los estudios clínicos en fase I de (+)-discodidermolido realizados por Novartis demostraron una moderada toxicidad desde 0.6 mg/m² hasta 19.2 mg/m² y una favorable farmacocinética, dichos ensayos

¹³⁴ Hung D. T., Nerenberg J. B., Schreiber S. L. *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 67.

¹³⁵ Harried S. S., Lee, C. P., Yang G., Lee T. I., Myles D. C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6646.

¹³⁶ Paterson I., Lyothier I. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4933.

¹³⁷ Paterson I., Delgado O., Florence G. J., Lyothier I., O'Brien M., Scott J. P., Sereinig N. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 150.

¹³⁸ Smith A. B. 3rd, Kaufman M. D., Beauchamp T. J., La Marche M. J., Arimoto, H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1823.

¹³⁹ Smith III A. B., Beauchamp T. J., LaMarche M. J., Kaufman M. D., Qiu Y., Arimoto H., Jones D. R., Kobayashi K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 8654.

¹⁴⁰ Smith A. B. 3rd, Freeze B. S., Brouard I., Hirose T. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4405.

¹⁴¹ Mickel S. J., Sedelmeier G. H., Niederer D., Daeffler R., Osmani A., Schreiner K., Seeger-Weibel M., Brod B., Schaer K., Gamboni R., Chen S., Chen W., Jagoe C. T., Kinder F. R., Loo M., Prasad K., Repic O., Shieh W.-C., Wang R.-M., Waykole L., Xu D. D., Xue *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 92.

¹⁴² Mickel S. J., Sedelmeier G. H., Niederer D., Schuerch F., Grimler D., Koch G., Daeffler R., Osmani A., Hirni A., Schaer K., Gamboni R., Bach A., Chaudhary A., Chen S., Chen W., Hu B., Jagoe C. T., Kim H.-Y., Kinder F. R., Liu Y., Lu Y., McKenna J., Prashad M., Ramsey T. M., Repic O., Rogers L., Shieh W.-C., Wang R.-M., Waykole L. *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 101.

¹⁴³ Mickel S. J., Sedelmeier G. H., Niederer D., Schuerch F., Koch G., Kuesters E., Daeffler R., Osmani D., Seeger-Weibel M., Schmid V., Hirni A., Schaer K., Gamboni R., Bach A., Chen S., Chen W., Geng P., Jagoe C. T., Kinder F.R. Jr., Lee G. T., McKenna J., Ramsey T. M., Repic O., Rogers L., Shieh W.-C., Wang R.-M., Waykole L. *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 107.

¹⁴⁴ Mickel S. J., Sedelmeier G. H., Niederer D., Schuerch F., Koch G., Kuesters E., Daeffler R., Osmani D., Seeger-Weibel M., Schmid V., Hirni A., Schaer K., Gamboni R., Bach A., Chen S., Chen W., Geng P., Jagoe C. T., Kinder F.R. Jr., Lee G. T., McKenna J., Ramsey T. M., Repic O., Rogers L., Shieh W.-C., Wang R.-M., Waykole L., Xue S., Florence G., Paterson I. *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 113.

¹⁴⁵ Mickel S. J., Niederer D., Daeffler R., Osmani D., Kuesters E., Schmid E., Schaer K., Gamboni R., Chen W., Loeser E., Kinder F.R. Jr., Konigsberger K., Prasad K., Ramsey T. M., Repic O., Wang R.-M., Florence G., Lyothier I., Paterson I. *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 122.

¹⁴⁶ Hung D. T., Chen J., Schreiber S. L. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 287.

¹⁴⁷ Haar E., Kowalski R. J., Hamel E., Lin C. L., Longley R. E., Gunasekera S. P., Rosenkranz H. S., Day B. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 243.

¹⁴⁸ Kowalski R. J., Giannakakou P., Gunasekera S. P., Longley R. E., Day B. W., Hamel E. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 613.

¹⁴⁹ Martello L. A., McDaid H. M., Regl D. L., Yang CH. P., Meng D., Pettus T. R. R., Kaufman M. D., Arimoto H., Danishefsky S. J., Smith III A. B., Horwitz S. B. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1978.

¹⁵⁰ Giannakakou, P., Fojo, T. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1613.

¹⁵¹ Honore S., Kamath K., Braguer D., Horwitz S. B., Wilson L., Briand C., Jordan M. A. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4957.

¹⁵² Chen, J. G., Horwitz, S. B. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1935.

¹⁵³ Bröker L. E., Huisman C., Ferreira C. G., Rodriguez J. A., Kruyt F. A., Giaccone G. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4081.

¹⁵⁴ Honore S., Kamath K., Braguer D., Wilson L., Briand C., Jordan M. A. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 1303.

¹⁵⁵ Smith III A. B., Freeze B. S., LaMarche M. J., Sager J., Kinzler K. W., Vogelstein B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3623.

fueron suspendidos debido a su baja eficacia y a problemas de toxicidad. En la actualidad, los estudios están enfocados a su posible uso en terapias de combinación con otros fármacos.^{156,157}

Criptoficinas

Las criptoficinas son compuestos que se unen a microtúbulos que fueron aislados de una cianobacteria marina como resultado de una extensa colaboración entre la universidad e industria que permitió además el diseño de diversos análogos sintéticos.

La criptoficina A fue aislada por primera vez de la cepa ATCC53789 de cianobacteria *Nostoc* sp. por el grupo de investigación de Pr. Schwartz, publicando estos resultados en 1990.¹⁵⁸ Aunque se encontró que era muy potente en ratones infectados con *Cryptococcus* spp., estos estudios se interrumpieron porque resultó ser demasiado tóxica. Con posterioridad, el grupo del profesor Moore en la Universidad de Hawaii volvió a aislarla en 1994 de la cepa GSV 224 de otra *Nostoc* sp. cultivada en agua dulce,¹⁵⁹ cambiándole el nombre por el de criptoficina-1 (Crp-1).

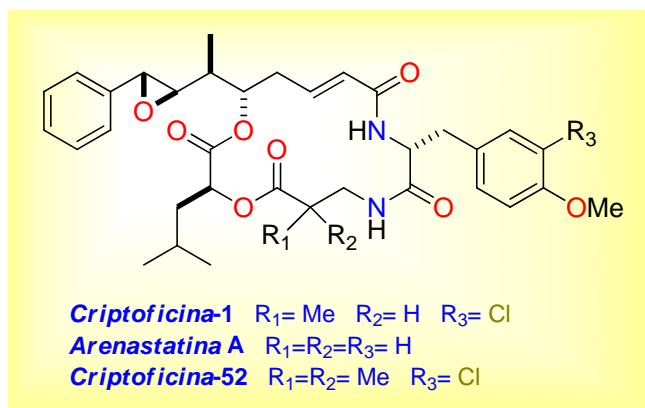


Figura 7. Estructura de la criptoficina A y la de algunos de sus análogos.

La Crp-1 mostró valores de IC₅₀ de 3 pg/mL y 5 pg/mL contra células de carcinoma KB y células del adenocarcinoma de colon 38 y 51 LoVo, respectivamente. También mostró actividad *in vivo* contra masas cancerosas de tumores de adenocarcinoma de colon 38 y 51, resistentes a paclitaxel y a células M16 mamarias, así como en modelos de adenocarcinoma pancreático 3 de ratón.¹⁵⁹ La síntesis total y la revisión de su estructura data de 1995.¹⁶⁰

Arenastatina A es un compuesto muy similar a Crp-1 (Figura 7) aislado por Kobayashi de la esponja *Dysidea arenaria*,¹⁶¹ que resultó ser idéntico a Crp-24, uno de los 27 análogos de criptoficina aislados por Moore.

Las Universidades americanas de Hawaii y Wayne State de los EE.UU. cedieron la licencia a la empresa Eli Lilly para su posible desarrollo como fármacos.

¹⁵⁶ Pellicciotta I., Yang C. P., Venditti C. A., Goldberg G. L., Shahabi S. *Cancer Cell Int.* **2013**, 13, 33.

¹⁵⁷ Smith A. B., Sugawara K., Atasoylu O., Yang C. P., Horwitz S. B. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 6319.

¹⁵⁸ Schwartz R. E. *J. Ind. Microbiol.* **1990**, 5, 113.

¹⁵⁹ Trimurtulu G., Ohtani I., Patterson G. M. L., Moore R. E., Corbett T. H., Valeriote F. A., Demchik L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4729.

¹⁶⁰ Barrow R. A., Hemscheidt T., Liang J., Paik S., Moore R. E., Tius M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2479.

¹⁶¹ Kobayashi M., Aoki S., Ohayabu N., Kurosu M., Wang W., Kitagawa I. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7969.

Las criptoficinas son unos potentes agentes antiproliferativos y antimitóticos. Su mecanismo de acción se atribuye a la desestabilización de la dinámica de los microtúbulos y a la inducción de hiperfosforilación de la proteína anti-apóptica B-leucemia/linfoma2 (BCL-2), provocando la muerte celular.¹⁶² La propiedad antimitótica está relacionada con la interacción con la tubulina, mediante un mecanismo parecido a la de la hemisterlina/HTI-286, lo que promueve la despolimerización de microtúbulos.^{163,164,165,166} La concentración necesaria de criptoficinas para inducir la hiperfosforilación de BCL-2 en células humanas H460 NSCLC es tres veces más alta que la de paclitaxel, y a esta concentración, el ciclo de la célula se detiene en la fase G2/M.

Un análogo sintético de la Crp-1, la criptoficina-52 (LY355703), fue desarrollado por Eli Lilly para mejorar su estabilidad hidrolítica y su formulación. Es menos sensible a glicoproteína, siendo de 40 a 400 veces más potente que los alcaloides tipo vinca o que paclitaxel frente a diversas líneas celulares.¹⁶⁷ La criptoficina-52 fue seleccionada para análisis clínicos en fase I a finales de los noventa en pacientes con masas de tumores sólidos.^{168,169} Las toxicidades con relación a la dosis incluyeron neuropatías, mialgia, neuroconstipación y toxicidad neurosensorial, además de arritmia cardíaca y alopecia.

Los estudios clínicos de fase II realizados con pacientes en estado IIb o IV que habían sido tratados previamente mediante quimioterapia de agentes de platino, mostraron que la criptoficina-52 no respondía en las dosis adecuadas para inducir la toxicidad neurológica.¹⁷⁰ Por esta razón, la criptoficina-52 ha sido eliminada temporalmente de la lista de los agentes anticancerosos. A pesar de esto, los nuevos análogos^{171,172,173} criptoficina-309 y criptoficina-249 han dado resultados muy positivos en los ensayos preclínicos, siendo lo suficientemente buenos para que entren de nuevo en análisis clínicos.¹⁷⁴

Dolastatina 10

Fruto de una colaboración entre el grupo dirigido por el profesor Pettit y el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los EE.UU. se obtuvo y se desarrolló el potente antitumoral dolostatina 10. El descubrimiento de las dolostatinas comenzó en el oeste del Océano Índico, lográndose aislar una serie de péptidos citotóxicos de la liebre de mar *Dolabella auricularia* (Figura 8).¹⁷⁵ Los extractos alcohólicos de este molusco mostraron una potente actividad contra las células linfáticas de leucemia P-388 a concentraciones subnanomolares (ED₅₀ 4.6 .

¹⁶² Lu K., Dempsey J., Schultz R. M., Shih C., Teicher B. A. *Chemother. Pharmacol.* **2001**, 47, 170.

¹⁶³ Mooberry S. L., Taoka C. R., Busquets, L. *Cancer Lett.* **1996**, 107, 53.

¹⁶⁴ Kerksiek K., Mejillano M. R., Schwartz R. E., George G. I., Himes, R. H. *FEBS Lett.* **1995**, 377, 59.

¹⁶⁵ Smith C. D., Zhang X. Q. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6192.

¹⁶⁶ Panda D., Himes R. H., Moore R. E., Wilson L., Jordan M. A. *Biochemistry* **1997**, 36, 12948.

¹⁶⁷ Wagner M. M., Paul D. C., Shih Ch., Jordan M. A., Wilson L., Williams D. C. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, 43, 115.

¹⁶⁸ De Jonge M.J.A., Verweij J., van der Gaast A., Valota O., Mora O., Th. A.S., Planting A.S.T., Mantel M.A., Van Den Bosch S., S.V.D., Lechuga M.J., Fiorentini F., Hess D., Sessa C. *Eur. J. Cancer* **2002**, 38, 2388.

¹⁶⁹ Stevenson J. P., Sun W., Gallager M., Johnson R., Vaughn D., Schuchter L., Algazy K., Hahn S., Enas N., Ellis D., Thornton D., O'Dwyer P. J. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 2524.

¹⁷⁰ Edelman M. J., Gandar D. R., Hausner P., Israel V., Thornton D., DeSanto J., Doyle L. A. *Lung Cancer* **2003**, 39, 197.

¹⁷¹ Nahrwold M., Weiß C., Bogner T., Mertink F., Conradi J., Sammet B., Palmisano R., Royo Gracia S., Preuß T., Sewald N. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1853.

¹⁷² Weiß C., Bogner T., Sammet B., Sewald N. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 2060.

¹⁷³ Bolduc K. L., Larsen S. D., Sherman D. H. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 6414.

¹⁷⁴ Liang J., Moore R. E., Moher E. D., Munroe J. E., Al-awar R. S., Hay D. A., Varie D. L., Zhang T. Y., Aikins J. A., Martinelli M. J., Kushner J., Simpson C., Pugh S., Corbett T. H. *Investig. New Drugs* **2005**, 23, 213.

¹⁷⁵ Pettit G. R. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1997**, 70, 1.

10^{-5} $\mu\text{g/mL}$).¹⁷⁶ Este valor impulsó un laborioso proceso de extracción de casi dos toneladas de *Dolabella auricularia* que permitió aislar 1 mg de dolostatina 10.¹⁷⁷

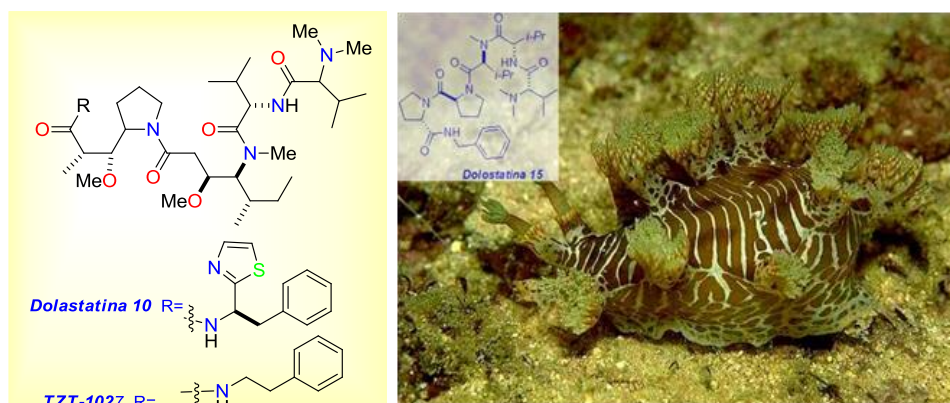


Figura 8. Estructuras de dolostatina 10 y de su derivado sintético TZT-1027, y la liebre de mar *Dollabella auriculata* de la que se aísla.

Dolostatina 10 es un péptido que contiene cuatro aminoácidos que no habían sido nunca descritos: la *N,N*-dimetilvalina, la dolaisoleucina, la dolaprolina y la dolafenina (posiblemente biosintetizada a partir de la fenilalanina).¹⁷⁶ Su síntesis total fue publicada en 1989 lo que permitió determinar su configuración absoluta.¹⁷⁸

Dolostatina 10 es un potente agente antimitótico que inhibe el ensamblaje de los microtúbulos en la polimerización de la tubulina. Estos agentes antimitóticos, al igual que HTI-286 ó la Crp-1, modifican el mismo lugar de unión con la tubulina en el denominado dominio vinca,^{179,180} y como consecuencia detienen la mitosis.¹⁸¹ Una de las razones de la elevada actividad antimitótica de este péptido (IC_{50} 1.2 μM) es que prolonga la retención intracelular, lo que facilita su unión a la tubulina.¹⁸²

En los ensayos *in vitro*, la dolostatina 10 ha demostrado una actividad inhibitoria importante contra varias líneas celulares cancerígenas humanas de melanoma, de sarcoma y de ovario,¹⁷⁶ que justificaron su entrada en los ensayos clínicos. Primeramente, los ensayos de fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados, mostraron que la dosis máxima tolerada era de 300-400 $\mu\text{g/m}^2$.^{183,184} Posteriormente, progresó en los análisis clínicos de fase II como un compuesto individual contra el adenocarcinoma de próstata,¹⁸⁵ NSCLC,¹⁸⁶ melanoma,¹⁸⁷ cáncer colorectal,¹⁸⁸ sarcomas de tejido blando,¹⁸⁹ cáncer de mama¹⁹⁰ y cáncer

¹⁷⁶ Pettit G. R., Kamano Y., Herald C. L., Tuinman A. A., Boettner F. E., Kizu H., Schmidt J. M., Baczynskyj L., Tomer K. B., Bontems R. J. J. *Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6883.

¹⁷⁷ Pettit G. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 812.

¹⁷⁸ Pettit G. R., Singh S. B., Hogan F., Lloyd-Williams P., Herald D. L., Burkett D. D., Clewlow P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 5463.

¹⁷⁹ Bai R., Pettit G. R., Hamel E. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 39, 1941.

¹⁸⁰ Bai R., Pettit G. R., Hamel E. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 17141.

¹⁸¹ Bai R., Friedman S. J., Pettit G. R., Hamel E. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 2637.

¹⁸² Verdier-Pinard P., Kepler J. A., Pettit G. R., Hamel E. *Mol. Pharmacol.* **2000**, 57, 180.

¹⁸³ Pitot H. C., McElroy Jr. E. A., Reid J. M., Windebank A. J., Sloan J. A., Erlichman C., Bagniewski P. G., Walker D. L., Rubin J., Goldberg R. M., Adjei A. A., Ames M. M. *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 525.

¹⁸⁴ Madden T., Tran H. T., Beck D., Huie R., Newman R. A., Pusztai L., Wright J. J., Abbruzzese J. L. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 1293.

¹⁸⁵ Vaishampayan U., Glode M., Du W., Kraft A., Hudes G., Wright J., Hussain M. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 4205.

¹⁸⁶ Krug L. M., Miller V. A., Kalemkerian G. P., Kraut M. J., Ng K. K., Heelan R. T., Pizzo B. A., Perez W., McClean N., Kris M. G. *Ann. Oncol.* **2000**, 11, 227.

¹⁸⁷ Margolin K., Longmate J., Synold T. W., Gandara D. R., Weber J., Gonzalez R., Johansen M. J., Newman R., Baratta T., Doroshow J. H. *Invest. New Drugs* **2001**, 19, 335.

¹⁸⁸ Everardo D. S., Eric H. K., Paulo M. H., Dennis F. Jr. M., Donnah J., Richard P., James L. A. *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**, 25, 451.

¹⁸⁹ Von Mehren M. *Sarcoma* **2004**, 8, 107.

pancreaticobiliar.¹⁹¹ Aunque su perfil de toxicidad fue aceptable, los resultados no fueron los esperados, lo que llevó a suspender los análisis clínicos antitumorales en fase II.

Otros análogos sintéticos^{192,193} de dolostatina 10, el TZT-1027,¹⁹⁴ que se diferencia estructuralmente en la sustitución del aminoácido dolafenina por el de feniltiamina, entró en los ensayos clínicos en fase I en Japón, Europa y en los Estados Unidos.^{195,196} Posee una actividad anticancerosa frente a varios modelos de cáncer en ratones,¹⁹⁵ con un mecanismo de acción similar al de dolostatina 10, es decir, se unen intimamente a la tubulina e inhiben su polimerización con la misma potencia (IC₅₀ 2.2nM y 2.3mM respectivamente), pero se diferencian en que TZT-1027 actúa como inhibidor de microtúbulo y del bloqueo vascular.¹⁹⁷ Dolastatina 10 desplaza completamente a la tubulina enlazada a TZT-1027.¹⁹⁸

La brentuximab vedotina (Adcetris) es uno de los nuevos agentes anticancerosos aprobados que está relacionado con estos péptidos. Consiste en un anticuerpo quimérico conectado a dolastatina 10 por medio de un espaciador, cuya liberación se puede modular con una proteasa.¹⁹⁹

Halicondrina B y mesilato de eribulina

El descubrimiento del mesilato de eribulina, análogo sintético simplificado del compuesto antitumoral halicondrina, es un ejemplo del resultado de investigaciones multidisciplinarias que permitieron desarrollar un candidato prometedor contra el cáncer mientras se trataba de solucionar el problema de suministro de un producto natural.

El grupo de investigación del profesor Uemura publicó en 1986, el aislamiento de halicondrina B, norhalicondrina B y homohalicondrina (Figura 9) a partir de los extractos de *Halichondria okadai*, la misma esponja de la que también se aísla el ácido okadaico.^{200,201}

¹⁹⁰ Perez E. A., Hillman D. W., Fishkin P. A., Krook J. E., Tan W. W., Kuriakose P. A., Alberts S. R., Dakhil S. R. *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 257.

¹⁹¹ Kindler H. L., Toth P. K., Wolff R., McCormack R. A., Abbruzzese J. L., Mani S., Wade-Oliver K. T., Vokes E. E. *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 489.

¹⁹² Gajula P. K., Asthana J., Panda D., Chakraborty T. K. *J. Med. Chem.* **2013**, *28*, 2235.

¹⁹³ Pettit G. R., Hogan F., Toms S. J. *Nat. Prod.* **2011**, *74*, 962.

¹⁹⁴ Kobayashi M. *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**, *88*, 316.

¹⁹⁵ Schöffski P., Thate B., Beutel G., Bolte O., Otto D., Hofmann M., Ganster A., Jenner A., Cheverton P., Wanders J., Oguma T., Atsumi R., Satomi M. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 671.

¹⁹⁶ De Jonge M. J. A., van der Gaast A., Planting A. S. T., van Doorn L., Lems A., Boot I., Wanders J., Satomi M., Verweij J. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3806.

¹⁹⁷ Hashiguchi N., Kubijota T., Koh J., Yamada Y., Saikawa Y., Otani Y., Watanabe M., Kumai K., Kitajima M., Watanabe J., Kobayashi M. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2201.

¹⁹⁸ Natsume T. *Jpn. J. Cancer Res.* **2000**, *91*, 737.

¹⁹⁹ Katz J., Janik J. E., Younes A. *Clin Cancer Res.* **2011**, *17*, 6428.

²⁰⁰ Hirata Y., Uemura D. *Pure App. Chem.* **1986**, *58*, 701.

²⁰¹ Uemura D., Takahashi K., Yamamoto T., Katayama C., Tanaka J., Okumura Y., Hirata Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4796.

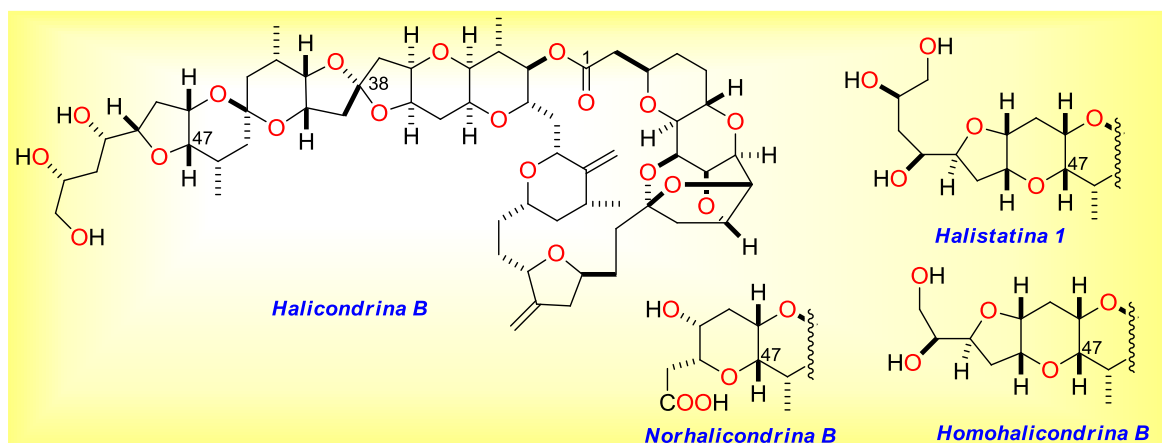


Figura 9. Estructura de halicondrina B y análogos, aislados de la esponja *Halichondria okadai*.

Los datos de toxicidad indicaron que la halicondrina B se une a la tubulina²⁰² en el denominado dominio vinca, una región en la que los alcaloides como viblastina o vincristina se unen a la tubulina.^{203,204} Los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados mostraron por resultados muy favorables, lo que llevó al Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NCI número NSC 60935) a iniciar ensayos clínicos en fase I en el año 2002.

La síntesis total de halicondrina B y norhalicocondrina B se publicó en 1992 y requirió de casi noventa pasos a partir de productos de partida comerciales,²⁰⁵ haciendo imposible su producción a gran escala por este método.

Una nueva fuente de halicondrinas fue descubierta a principios de 1990 en *Lissodendoryx* sp., una esponja de aguas profundas de la isla sur de Nueva Zelanda, por el grupo de los profesores Blunt y Munro de la Universidad de Canterbury de dicho país.^{206,207} Debido a la imposibilidad de conseguir suficiente cantidad de compuestos para sus estudios preclínicos a partir de esponjas en su ecosistema natural, se estudió la viabilidad de trasplantar la esponjas de su hábitat natural a hábitats artificiales para su cultivo.²⁰⁸ Aunque la supervivencia y el crecimiento de la esponja dependían mucho de la temperatura del agua y de la estación del año, se consiguió obtener un rendimiento aproximado de 0.4 mg/kg del halicondrina B y de aproximadamente 1.5 mg/kg de mezcla global de halicondrinas, que en cualquier caso era menor del que se obtenía de las recolectadas en su hábitat natural.²⁰⁸

Una empresa americana Eisai Inc. subsidiaria de la empresa japonesa Eisai Co., Ltd. preparó varios análogos sintéticos modificados de halicondrina B que tenían una actividad antitumoral equivalente a la del producto

²⁰² Bai R., Nguyen T. L., Burnett J. C., Atasoylu O., Munro M. H., Pettit G. R., Smith A. B. 3rd., Gussio R., Hamel E. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 1393.

²⁰³ Bai R. L., Paull K. D., Herald C. L., Malspeis L., Pettit G. R., Hamel E. *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 15882.

²⁰⁴ Dabeydeen D. A., Burnett J. C., Bai R., Verdier-Pinard P., Hickford S. J. H., Pettit G. R., Blunt J. W., Munro M. H. G., Gussio R., Hamel E. *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70, 1866.

²⁰⁵ Aicher T. D., Buszek K. R., Fang F. G., Forsyth C. J., Jung S. H., Kishi Y., Matelich M. C., Scola P. M., Spero D. M., Yoon S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3162.

²⁰⁶ Hart J. B., Lill R. E., Hickford S. J. H., Blunt J. W., Munro M. H. G. *Drugs from the Sea* Ed. Fusetani. Karger, Basel, **2000**.

²⁰⁷ Gravalos D. G., Lake R., Blunt J. W., Munro M. H. G., Litaudon M. S. P. Halichondrins: cytotoxic polyether macrolides. EP0572109 (B1) **1993**.

²⁰⁸ Munro M. H. G., Blunt J. W., Dumdei E. J., Hickford S. J. H., Lill R. E., Li S., Battershill C. N., Duckworth A. R. *J. Biotechnol.* **1999**, 70, 15.

natural.^{209,210,211} Uno de estos análogos fue el denominado mesilato de eribulina (E7389, NCI número NCS 707389, Figura 10) que pudo obtenerse a gran escala.²¹²

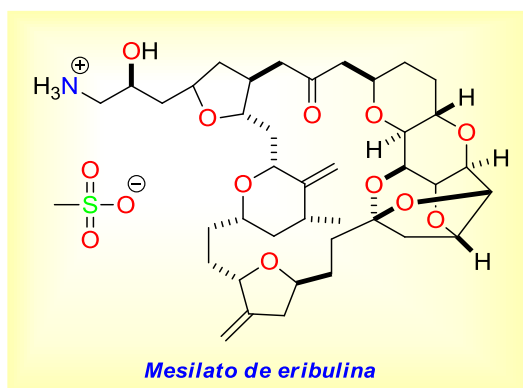


Figura 10. Estructura del mesilato de eribulina.

Como la halicondrina B, el mesilato de eribulina mostró una amplia actividad antiproliferativa contra tumores celulares mediante su unión a la tubulina y la inhibición de la mitosis del ciclo celular²¹³ que trajeron consigo que se iniciaran los ensayos clínicos en 2002. Los resultados publicados en 2006 de los ensayos en fase II como monoterapia para cáncer refractoria de mama²¹⁴ (en 88 pacientes) mostraron que la media de la respuesta confirmada fue de 113 días, encontrándose que su mayor toxicidad es la neutropaenia y leucopaenia (31 pacientes).²¹⁵ En otro estudio posterior en pacientes con cáncer de mama avanzado, los porcentajes de respuesta llegaron al 15% con toxicidades tolerables.²¹⁶ El mesilato de eribulina también mostró una respuesta de 9.7% en pacientes con NSCLC en comparación del 10.4% en pacientes pretratados con paclitaxel, obteniéndose una media de supervivencia de 9.6 meses.²¹⁷

En noviembre de 2010, la FDA de EEUU aprobó la utilización del mesilato de eribulina para el cáncer refractario de mama y recientemente la empresa America Eisai Pharmaceuticals lo lanzó al mercado en 2011 con el nombre de Halaven®.^{218,219,220}

Otros compuestos antitumorales marinos

Los compuestos antitumorales derivados de organismos marinos no son sólo antimetabólicos. Hay otros productos naturales de diversos organismos marinos con un amplio rango de estructuras químicas que poseen

²⁰⁹ Stamos D. P., Sean S. C., Kishi Y. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7552.

²¹⁰ Wang Y., Habgood G. J., Christ W. J., Kishi Y., Littlefield B. A., Yu M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1029.

²¹¹ Littlefield, B. A. Macrocyclic analogs and methods of their use and preparation. WO9965894 (A1) **1999**.

²¹² Yu, M. J., Kishi, Y., Littlefield, B. A. *Anticancer Agents from Natural Products* Eds. Cragg G. M., Kingston D. G. I., Newman, D. J. Taylor and Francis, Boca Raton, **2005**.

²¹³ Towle M. J. *Cancer Res.* **2001**, 61, 1013.

²¹⁴ Shablak A. *J Breast Cancer.* **2013**, 16,12.

²¹⁵ Forero J. B. *J. Clin. Oncol.* **2006**, 24 (Suppl. 18), 653.

²¹⁶ Blum J. L. *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25 (Suppl.18), 1034.

²¹⁷ Spira, A. I., *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25 (Suppl. 18), 7546.

²¹⁸ Menis J., Twelves C. *Targets Ther.* **2011**, 3, 101.

²¹⁹ Pean E.; Klaar S.; Berglund E. G.; Salmonson T.; Borregaard J.; Hofland K. F.; Ersbøll J.; Abadie E.; Giuliani R.; Pignatti F. *Clin Cancer Res.* **2012**, 18, 4491.

²²⁰ Twelves C. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* **2013**, 13, 251.

diferentes modos de acción citotóxica o citostática que también han entrado en ensayos clínicos, aunque ninguno ha sido aprobado como fármaco hasta la fecha.

Kahalalido F

Diferentes recolecciones del molusco gasterópodo *Elysia rufescens*, estudiado por el grupo del profesor Scheuer de la Universidad de Hawaii, trajeron consigo la publicación en 1993 del aislamiento de un nuevo compuesto antitumoral, el depsipéptido kahalalido F^{221, 222} (Figura 11), conjuntamente con otros análogos.^{223,224}

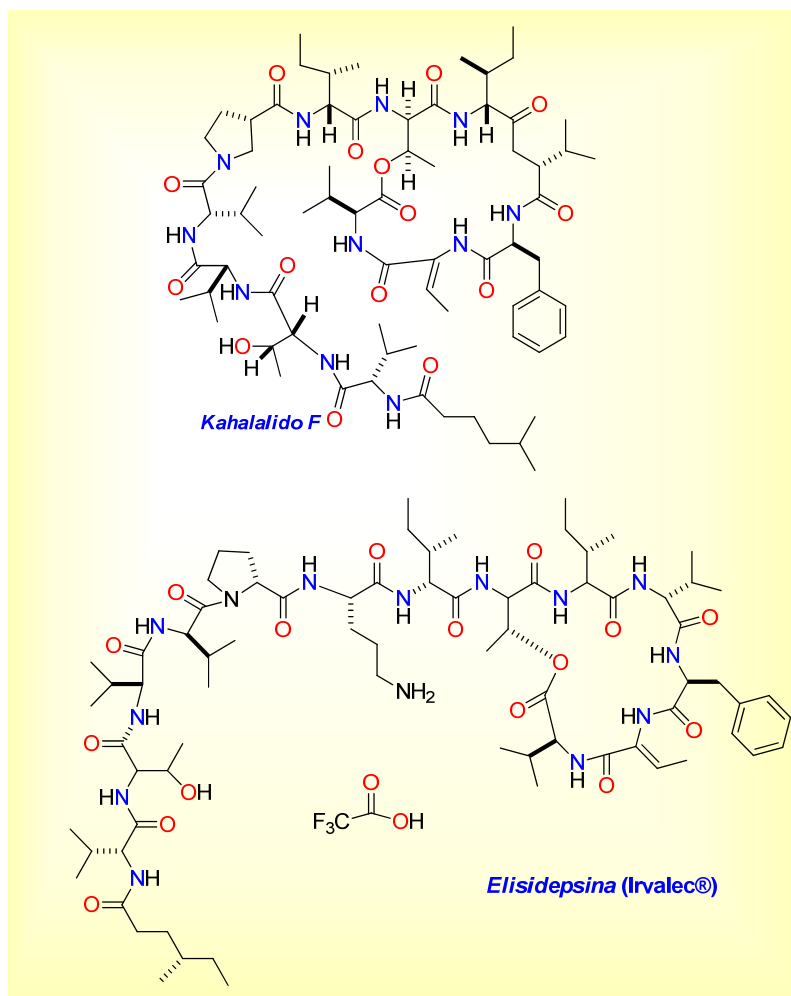


Figura 11. Kahalalido extraído del molusco *Elysia rufescens* y su derivado sintético elisidepsina.

Kahalalido F es un C₇₅-tridecapéptido cíclico que contiene aminoácidos no naturales, como el ácido Z-deshidroaminobutírico, también presente en otros péptidos naturales como el antibiótico cypemycina²²⁵ y la

²²¹ Hamann M. T., Scheuer P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5825.

²²² Goetz G., Yoshida W. Y., Scheuer P. J. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7739.

²²³ Hamann M. T., Otto C. S., Scheuer P. J., Dunbar D. C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6594.

²²⁴ Serova M., de Gramont A., Bieche I., Riveiro M. E., Galmarini C. M., Aracil M., Jimeno J., Faivre S., Raymond E. *Mar. Drugs*. **2013**, *11*, 944.

²²⁵ Minami Y., Yoshida K., Azuma R., Urakawa A., Kawauchi T., Otani T., Komiyama K., Ōmura S. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8001.

hassallidina A.²²⁶ *Elysea rufesens* es un gasterópodo herbívoro recolectado en Hawai que se alimenta de alga del género *Bryopsis*^{221,222,223} que es la verdadera fuente de kahalalido F. La concentración es más elevada en el molusco, llegando alcanzar entorno al 1%, mientras que en el alga es del 0.0002%.²²³ Parece que ambos lo utilizan como defensa química frente a depredadores.²²⁷

La configuración relativa de la estructura de kahalalido F primeramente propuesta, fue revisada. Así, cuando se sintetizó un péptido cíclico con la estructura propuesta originariamente para el kahalalido F,^{221,222} se observó que el compuesto sintético mostraba unos valores de actividad menores que los del producto natural. La revisión de la estructura, en la que se invirtió la configuración de Val₃ de L- a D- y la de Val₄ de D- a L-, y su posterior síntesis en fase sólida en la Universidad de Barcelona, permitió obtener un compuesto que presentó la misma actividad que el producto natural que confirmó la nueva estructura.^{228,229} La Universidad de Hawaii cedió la licencia de kahalalido F a Pharmamar a principios de los 90 para su desarrollo.

El mecanismo de acción de kahalalido F no ha sido elucidado totalmente. Kahalalido F es activo principalmente al nivel lisosomal e induce la vacuolización,²³⁰ lo que explicaría su actividad en tejidos que secretan proteínas lisomales como las células de la próstata. En líneas celulares cancerígenas de próstata y mama, kahalalido F induce la muerte celular por oncosis.²³¹ Una necrosis similar se observó en varias líneas celulares humanas de carcinoma, vulval, NSCLC, hepáticas y de colon,²³² en las cuales, la baja regulación de la proteína ERBB3 y la inhibición de 3-kinasa (PI3K)-AKT son determinantes para su citotoxicidad.²³³ También induce la formación de un canal como consecuencia de la permeabilidad en la membrana frente a células HepG2²³³ y es metabólicamente estable.²³⁴

Un estudio de kahalalido F en ratones mostró toxicidad renal usando la dosis máxima tolerada de 300 $\mu\text{g/kg}$ (1800 $\mu\text{g/m}^2$) administrada de forma intravenosa. Sin embargo, un régimen de múltiples dosis reduce la toxicidad inducida.²³⁵ Un estudio en fase I de cáncer de próstata usando un andrógeno refractario, determinó que la máxima dosis tolerada por día es de 930 $\mu\text{g/m}^2$ y en ensayos clínicos en fase III de 560 $\mu\text{g/m}^2$.²³⁶ De un estudio realizado en 32 pacientes, uno de ellos tratado con 80 $\mu\text{g/m}^2$ tuvo una respuesta parcial con un antígeno específico de próstata, llegando a una reducción del 50%, mientras que cinco pacientes mostraron una estabilización de la enfermedad. De los ensayos en fase I se concluyó que el tratamiento con kahalalido F supone una terapia positiva en tumores sólidos avanzados.²³⁷

²²⁶ Neuhof T., Schmieder P., Preussel K., Dieckmann R., Pham H., Bartl F., Döhren H. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 695.

²²⁷ Becerro M. A., Goetz G., Paul V. J., Scheuer, P. J. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, 2287.

²²⁸ Lopez-Macia A., Jimenez J. C., Royo M., Giralt E., Albericio F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11398.

²²⁹ Bonnard I., Manzanares I., Rinehart K. L. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1466.

²³⁰ García-Rocha M., Bonay P., Avila J. *Cancer Lett.* **1996**, 99, 43.

²³¹ Suárez Y., González L., Cuadrado A., Berciano M., Lafarga M., Muñoz A. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, 2, 863.

²³² Janmaat M. L., Rodriguez J. A., Jimeno J., Krut F. A. E., Giaccone G. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 502.

²³³ Sewell J. M., Mayer I., Langdon S. P., Smyth J. F., Jodrell D. I., Guichard S. M. *Eur. J. Cancer* **2005**, 41, 1637.

²³⁴ Sparidans R. W., Stokvis E., Jimeno J. M., López-Lázaro L., Schellens J. H. M., Beijnen J. H. *Anticancer Drugs* **2001**, 12, 575.

²³⁵ Brown A. P., Morrissey R. L., Faircloth G. T., Levine B. S. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, 50, 333.

²³⁶ Rademaker-Lakhai J. M., Horenblas S., Meinhardt W., Stokvis E., de Reijke T. M., Jimeno J. M., Lopez-Lazaro L., Lopez Martin J. A., Beijnen J. H., Schellens J. H. M. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 1854.

²³⁷ Pardo B., Paz-Ares L., Tabernero J., Ciruelos E., García M., Salazar R., López A., Blanco M., Nieto A., Jimeno J., Izquierdo M. A., Trigo J. M. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 1116.

La compañía farmacéutica española Pharmamar estudió el derivado del kahalalido F, la elisidepsina²³⁸ (Irvalec®, ver Figura 11), por su actividad contra carcinoma y sarcoma. Muestra además una notable actividad contra un tipo de tumores gastroesofágicos conocidos como adenocarcinomas indiferenciados de células grandes de esófago. Estos tumores sólo suponen el 1% de todos los cánceres de esófago y tienen una incidencia global muy baja. Por ello en el año 2012, al concluir la fase II se suspendió el desarrollo de dicho fármaco. En la actualidad se está estudiando el posible desarrollo de Irvalec® y kahalalido F para el tratamiento contra la psoriasis.²³⁹

Briostatina 1

El briozoo *Bugula neritina* es un organismo muy común que crece en las columnas de los puertos. El grupo del profesor Pettit de la Universidad Estatal de Arizona, en colaboración con el Instituto del Cáncer de (NCI) del los EE.UU., publicó en 1968 que los extractos de *Bugula neritina* recolectados en el Golfo de Méjico, mostraban una importante toxicidad contra las células de ratones de leucemia y linfocíticas P388.¹⁷⁷

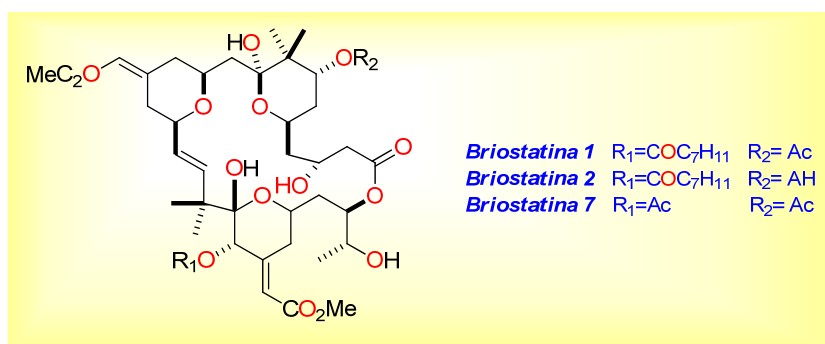


Figura 12. Estructura de las briostatinas aisladas del briozoo *Bugula Neritina*.

El aislamiento y la identificación de los principios activos fueron difíciles porque se estudiaron diferentes extractos de colecciones de distintas localizaciones que poseían una actividad muy baja. A partir de varias recolecciones a gran escala en el Golfo de California (Mar del Cortés) y a lo largo de la costa de California, EEUU, se pudo obtener el primer milígramo del compuesto activo que se denominó briostatina 1, (Figura 12) cuya estructura se determinó por análisis espectroscópicos y cristalografía de rayos-X.

La briostatina 1 es una lactona macrólida de 26 miembros, con 11 estereocentros, que posee un esqueleto carbonado de policétido sin ningún precedente en la química de productos naturales.²⁴⁰ Se aislaron posteriormente otras 19 briostatinas de *B. neritina*, cuya principal diferencia estructural radica en la sustitución de las posiciones C₇ y C₂₀ por diferentes grupos aciloxi.¹⁷⁷

Este macrólido mostró una potente actividad *in vitro* frente a la línea tumoral de linfomas de leucemia P-388 con un ED₅₀=0.89 µg/mL.²³⁵ A pesar de su escasa abundancia (aprox. 0.01 ppm) y su variable presencia natural, se logró aislar suficiente cantidad para realizar los ensayos preclínicos y clínicos. En 1991 se llevó a cabo un proceso de aislamiento y purificación a gran escala que permitió obtener 18 g de briostatina 1 a partir

²³⁸ Serova M., de Gramont A., Bieche I., Riveiro M. E., Galmarini C. M., Aracil M., Jimeno J., Faivre S., Raymond E. *Mar Drugs*. **2013**, *11*, 944.

²³⁹ Faircloth G. T., Elices M., Sasak H., Avilés Marín P. M., Cuevas Marchante M. C., Patente WO **2004**/035613.

²⁴⁰ Pettit G. R., Herald C. L., Doubek D. L., Herald D. L., Arnold E., Clardy J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846.

de aproximadamente 38 kilos de *B. neritina*.²⁴¹ Mientras tanto, una compañía del sur de California llamada CalBiomarine Technologies, encontró unas condiciones idóneas para su cultivo, de forma que se pudo controlar las variables que permitieron incrementar su producción.²⁴² Se han logrado sintetizar briostatina 1,^{243,244} briostatina 2,²⁴⁵ briostatina 3,^{246,247} y briostatina 7.^{248,249,250,251,252} Estudios de las relaciones estructura-actividad para este tipo de compuestos²⁵³ realizados en la Universidad de Stanford de EE.UU. mostraron que el mínimo farmacóforo de briostatina 1 requiere la presencia de átomos de oxígeno en posiciones C1, C19 y C26.²⁵⁴ Estos resultados llevaron a la preparación de un análogo simplificado de la briostatina 2, llamado briopirano, en menos etapas sintéticas que las requeridas para la síntesis de los productos naturales.^{255,256} Este análogo mas sencillo está siendo sometido a ensayos clínicos.

Se ha propuesto que la actividad citotóxica de briostatina 1 es debida a que actúa como modulador de la proteína kinasa C (PKC).^{257,255,256} Una pequeña exposición de células tumorales a la briostatina 1 induce la activación de la PKC, su fosforilización y su traslocación en membrana. Así, tras una larga exposición de las células tumorales a la briostatina 1 se origina un envejecimiento de la célula, probablemente debido a la proteólisis del proteasoma.²⁵⁴ La briostatina 1 también posee otras actividades farmacológicas como son la modulación de sistema inmune,²⁵⁸ la inducción a la diferenciación de la célula,²⁵⁹ la radioprotección²⁶⁰ y las interacciones sinérgicas con otros agentes anticancerosos como ara-C, paclitaxel, tamoxifeno, auristatina PE, dolastatina, vincristina, doxorubicina y prednisona.²⁶¹

Dada esta actividad tan prometedora, briostatina 1 está siendo investigado sólo o en combinación de otros agentes quimioterapéuticos en numerosos ensayos clínicos (fase I, fase II y fase III) para leucemia mieloide,

²⁴¹ Schaufelberger D.E., Koleck M. P., Beutler J. A., Vatakis A. M., Alvarado A. B., Andrews P., Marzo L. V., Muschik G. M., Roach J., Ross J. T., Lebherz W. B., Reeves M. P., Eberwein, Lori L. Rodgers R. M., Testerman R. P., Snader K. M., Forenza S. J. *Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1265.

²⁴² Rouhi M. A. *Chem. Eng. News* **1995**, *73*, 42.

²⁴³ Hale K. J., Manaviazar S. *Chem Asian J.* **2010**, *5*, 704.

²⁴⁴ Manaviazar S., Hale K. J. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2011**, *50*, 8786.

²⁴⁵ Evans D. A., Carter P. H., Carreira E. M., Charette A. B., Prunet J. A., Lautens M. J. *Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7540.

²⁴⁶ Ohmori K., Ogawa Y., Obitsu T., Ishikawa Y., Nishiyama S. Yamamura S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2290.

²⁴⁷ Ohmori K. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **2004**, *77*, 875.

²⁴⁸ Kageyama M., Tamura T., Nantz M. H., Roberts J.C., Somfai P., Whritenour D. C., Masamune S. *Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7407.

²⁴⁹ Blanchette M. A., Malamas M. S., Nantz M. H., Roberts J. C., Somfai P., Whritenour D. C., Masamune S., Kageyama M., Tamura T. J. *Org. Chem.* **1989**, *54*, 2817.

²⁵⁰ Voight E. A., Seradi H., Roethle P. A., Burke S. D. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4045.

²⁵¹ DeBrabander J., Vandewalle M. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 715.

²⁵² Kedei N., Lewin N. E., Géczy T., Selezneva J., Braun D. C., Chen J., Herrmann M. A., Heldman M. R., Lim L., Mannan P., Garfield S. H., Poudel Y. B., Cummins T.J., Rudra A., Blumberg P. M., Keck G. E. *ACS Chem Biol.* **2013**, *8*, 767.

²⁵³ Ruan B.F., Zhu H. L. *Curr Med Chem.* **2012**, *19*, 2652.

²⁵⁴ Isakov N., Galron D., Mustelin T., Pettit G. R., Altman A. J. *Immunol.* **1993**, *150*, 1195.

²⁵⁵ Wender P. A., Brabander J.D., Harran P. G., Jimenez J. M., Koehler M. F. T., Lippa B., Park C. M., Shiozaki M. J. *Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4534.

²⁵⁶ Wender P. A., Cribbs C. M., Koehler K. F., Sharkey N. A., Herald C. L., Kamano Y., Pettit G. R., Blumberg P. M. C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 7197.

²⁵⁷ Hennings H., Blumberg P. M., Pettit G. R., Herald C. L., Shores R., Yuspa S. H. *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 1343.

²⁵⁸ Berkow R. L., Schlabach L., Dodson R., Benjamin W. H., Jr., Pettit G. R., Rustagi P., Kraft A. S. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2810.

²⁵⁹ Hu Z. B., Ma W. L., Uphoff C. C., Lanotte M. Drexler, H. G. *Leukemia* **1993**, *7*, 1817.

²⁶⁰ Grant S., Pettit G. R. McCrady C. *Exp. Hematol.* **1992**, *20*, 34.

²⁶¹ Mutter R., Wills M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1841.

leucemia linfática, melanoma, linfoma de non-Hodgkins y NSCLC, mieloma metastático,²⁶² reincidencia de leucemia linfática crónica.^{263,264,265,266.}

El límite tóxico de la dosis en todos los casos es mialgia, lo cual explica la vasoconstricción muscular como el efecto tóxico del briostatina 1.²⁶⁷ Los ensayos clínicos en fase II la descartaron como agente terapéutico individual frente a cánceres de cabeza y cuello,²⁶⁸ cáncer colorectal,²⁶⁹ melanoma,²⁷⁰ carcinoma renal²⁷¹ y cáncer de ovario.²⁷² Sin embargo, los análisis de clínicos en fase I cuando se combina con 1- β -D-arabinofuranosilcitosina para leucemia aguda²⁷³ y con vincristina contra células malignas B²⁷⁴ fueron prometedores. Los pacientes de estos ensayos clínicos alcanzaron el objetivo de estabilización y remisión de la enfermedad. También se llevaron a cabo cinco ensayos clínicos en fase II de la evolución de briostatina 1 con rituximab, vincristinas, temsirolimus, cladribina o interleukina 1 frente a células linfáticas del linfoma no-hodgkin, metástasis de tumores sólidos, leucemia linfática y tumores sólidos que fueron subvencionados por el NCI de los Estados Unidos (www.cancer.gov/clinicaltrials). Adicionalmente, briostatina 1 ha sido evaluada en combinación con paclitaxel para el tratamiento de tumores sólidos, consiguiéndose una mayor respuesta que con sólo paclitaxel. Desgraciadamente casi un tercio de los pacientes tuvo que dejar la terapia debido a las mialgias.²⁷⁵ En otros estudios, la briostatina 1 está siendo estudiada en terapias cuyo objetivo es lograr intervenir en el ciclo celular.²⁷⁶ Se siguen realizando estudios biológicos de briostatina 1 y sus derivados con el fin de buscar nuevas aplicaciones biológicas.^{277,278}

²⁶² Propper D. J., Macaulay V., O'Byrne K. J., Braybrooke J. P., Wilner S.M., Ganesan T. S., Talbot D.C., Harris A.L. *J. Cancer* **1998**, *78*, 1337.

²⁶³ Varterasian M. L., Mohammad R. M., Shurafa M. S., Hulburd K., Pemberton P. A., Rodriguez D. H., Spadoni V., Eilender D. S., Murgo A., Wall N., Dan M., Al-Katib A.M. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 825.

²⁶⁴ Varterasian M. L., Pemberton A., Hulburd K., Rodriguez D. H., Murgo A., Al-Kabib A. M. *Invest. New Drugs* **2001**, *19*, 245.

²⁶⁵ Varterasian M. L., Mohammad R. M., Shurafa M. S., Hulburd K., Pemberton P. A., Rodriguez D. H., Spadoni V., Eilender D. S., Murgo A., Wall N., Dan M., Al-Katib A. M. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 825.

²⁶⁶ Grant S., Roberts J., Poplin E., Tombes M. B., Kyle B., Welch D., Carr M., Bear H. D. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 611.

²⁶⁷ Hickman P.F., Kemp G. J., Thompson C. H., Salisbury A. J., Wade K., Harris A. L., Radda G. K. *Br. J. Cancer* **1995**, *72*, 998.

²⁶⁸ Pfister D. G., McCaffrey J., Zahalsky A. J., Schwartz G. K., Lis E., Gerald W., Huvos A., Shah J., Kraus D., Shaha A., Singh B., Wolden S., Zelefsky M., Palgi I. *Invest. New Drugs* **2002**, *20*, 123.

²⁶⁹ Zonder J. A., Shields A. F., Zalupski M., Chaplen R., Heilbrun L. K., Arlauskas P., Philip P. A. *Cancer Res.* **2001**, *7*, 38.

²⁷⁰ Bedikian, A. Y.; Plager, C.; Stewart, J. R.; O'Brian, C. A.; Herdman, S. K.; Ross, M.; Papadopoulos, N.; Eton, O.; Ellerhorst, J.; Smith, T. *Melanoma Res.* **2001**, *11*, 183.

²⁷¹ Pagliaro L., Daliani D., Amato R., Tu S., Jones D., Smith T., Logothetis C., Millikan R. *Cancer* **2000**, *89*, 615.

²⁷² Clamp A. R., Blackhall F. H., Vasey P., Soukop M., Coleman R., Halbert G., Robson L., Jayson G. C. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 1152.

²⁷³ Cragg L. H., Andreeff M., Feldman E., Roberts J., Murgo A., Winning M., Tombes M., Roboz G., Kramer L., Grant S. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2123.

²⁷⁴ Dowlati A., Lazarus H. M., Hartman P., Jacobberger J. W., Whitacre C., Gerson S. L., Ksenich P., Cooper B. W., Frisa P. S., Gottlieb M., Murgo A. J., Remick S. C. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5929.

²⁷⁵ Ajani, J. A. *Invest. New Drugs* **2006**, *24*, 353.

²⁷⁶ Schwartz, G. K.; Shah, M. A. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9408.

²⁷⁷ Kedei N., Lewin N. E., Géczy T., Selezneva J., Braun D. C., Chen J., Herrmann M. A., Heldman M. R., Lim L., Mannan P., Garfield S. H., Poudel Y. B., Cummins T. J., Rudra A., Blumberg P. M., Keck G.E. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 767.

²⁷⁸ Kedei N., Telek A., Michalowski A. M., Kraft M. B., Li W., Poudel Y. B., Rudra A., Petersen M. E., Keck G. E., Blumberg P. M. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 313.

Mirada al futuro

Como hemos visto con todos estos ejemplos, el desarrollo de los estudios de compuestos de origen natural con potente actividad terapéutica y que a su vez sean selectivos, está permitiendo la aparición de nuevos e innovadores métodos de obtención, ya sea por medio de acuicultura, semi-síntesis o la preparación de análogos sintéticos con propiedades optimizadas. En el pasado, los químicos de productos naturales fueron la clave del descubrimiento de compuestos farmacológicamente activos pero ahora la colaboración de farmacólogos, biólogos, médicos, etc. y de las empresas farmacológicas, está acelerando el camino que va desde el aislamiento y determinación estructural en la mesa del laboratorio hasta la farmacia. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los productos naturales marinos que han sido aprobados como fármacos.

Tabla 2. Compuestos de origen marino comercializados en la actualidad para el tratamiento de enfermedades humanas.

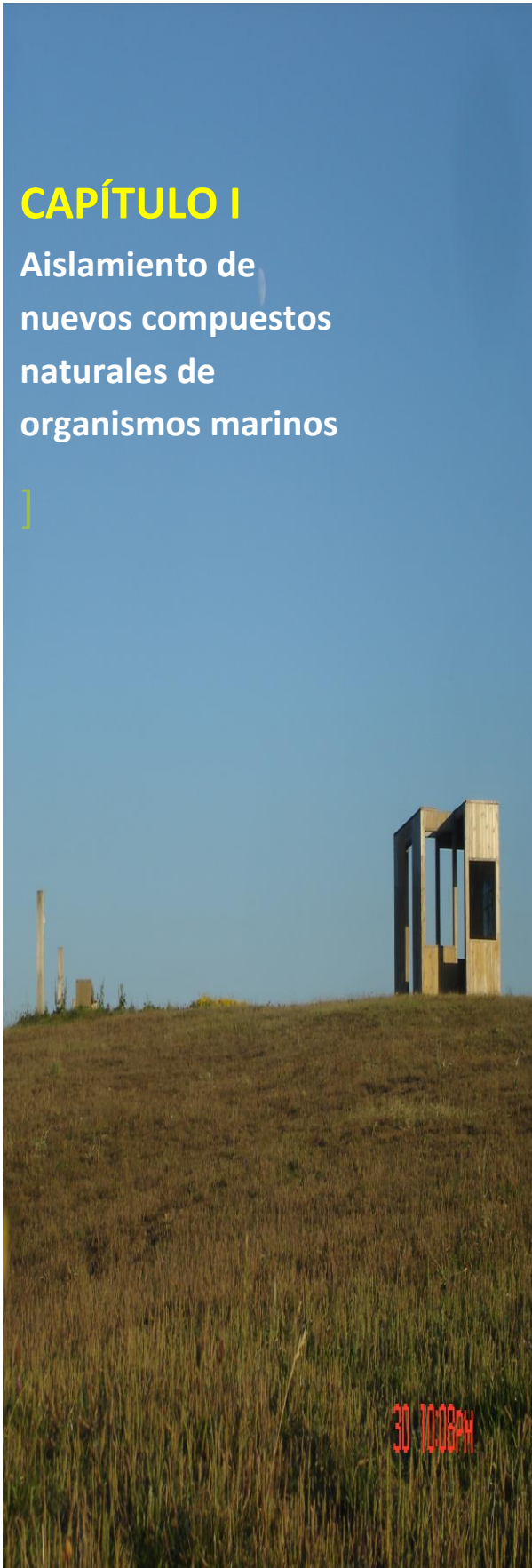
Nombre del compuesto	Nombre comercial	Organismo	Tipo de estructura	Mecanismo de acción	Nº de ensayos clínicos realizados o en curso www.clinicaltrials.gov (Feb.2013)	Aplicación	Compañía farmacéutica
Citarabina (Ara-C)	Cytosar-U®	Esponja	Nucleósido	Polimerasa del ADN	814	Cáncer	Laboratorios Bedford
Vidarabina (Ara-A)	Vira-A®	Esponja	Nucleósido	Polimerasa del ADN viral	0	Antiviral	-
Ziconotide	Prialt®	Caracol marino	Péptido	Túbulos tipo N	5	Dolor	Azurpharma
Mesilato de Eribulina (E7389)	Halaven®	Esponja	Macrólido	Microtúbulos	62	Cáncer	Eisai Inc
Omega-3-acidoetil esteres	Lovaza®	Pez	Ácidos grasos/ Omega-3	Síntesis de triglicéridos	124	Hipertrigliceridemia	GlaxoSmithKline
Trabectedina (ET-743)	Yondelis®	Tunicado	Alcaloide	ADN	42	Cáncer	Pharmamar
Brentuximab vedotin (SGN-35)	Adcetris®	Molusco /cianobacteria	Conjugado con anticuerpo monoclonal (MM auristatin E)	Microtúbulos	35	Cáncer	Seattle Genetics

Esto es una muestra de lo que puede deparar el futuro. Gracias a estas colaboraciones, los académicos consiguen mejorar y avanzar más rápidamente en las evaluaciones farmacológicas.

CAPÍTULO I

Aislamiento de
nuevos compuestos
naturales de
organismos marinos

]



I.1 OBJETIVOS

El objetivo principal en este primer capítulo es el estudio químico y la evaluación de la actividad farmacológica de los productos naturales aislados de los extractos de una serie de organismos marinos recolectados en diferentes localizaciones del Océano Pacífico. Los organismos estudiados fueron los siguientes:

- a) El coral blando *Briarum* sp. y la esponja *Dysidea* sp. recolectados durante dos expediciones realizadas en 1995 y 1996 a la isla de Sulawesi (Indonesia).
- b) El anélido poliqueto *Thelepus crispus*, recolectado en el Pacífico Norte cerca de Friday Harbor (estado de Washington en EEUU) por el Doctor Gregg Dietzman del Instituto White Point Biomarine de Washington en EEUU.

Para lograr este objetivo general se trazó el siguiente **plan de trabajo**:

1. Extracción de los diferentes organismos utilizando diversos esquemas de fraccionamiento con disolventes de diferentes polaridades.

2. Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios de interés mediante la utilización de técnicas cromatográficas, a saber, columnas de gel de sílice, gel filtración Sephadex LH20 y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

3. Identificación estructural de los metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bidimensional de protón y carbono trece, espectrometría de masas (MS) y espectroscopia de difracción de Rayos X. De forma desglosada estas técnicas fueron las siguientes:

RMN: ^1H , ^{13}C , DEPT, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, HETCOR, HMQC, HSQC, HSQC-editado, HMBC, HETLOC, J-HMBC y HSQC-HECADE.

MS: Ionización por Impacto electrónico (EI), bombardeo de átomos acelerados (FAB), electrospray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI).

Difracción de Rayos X de monocristal para aquellos compuestos de los que obtuvieron cristales adecuados.

4. Apoyo estructural mediante métodos computacionales usando búsquedas conformacionales con modelos de GMMX y cálculos de energía deducidos mediante la Teoría de Funcionales de Densidad (DFT)

5. Evaluación de la actividad citotóxica de los metabolitos aislados.

I.2 Resultados y discusión

I.2.1 Estudio del coral blando *Briareum* sp.

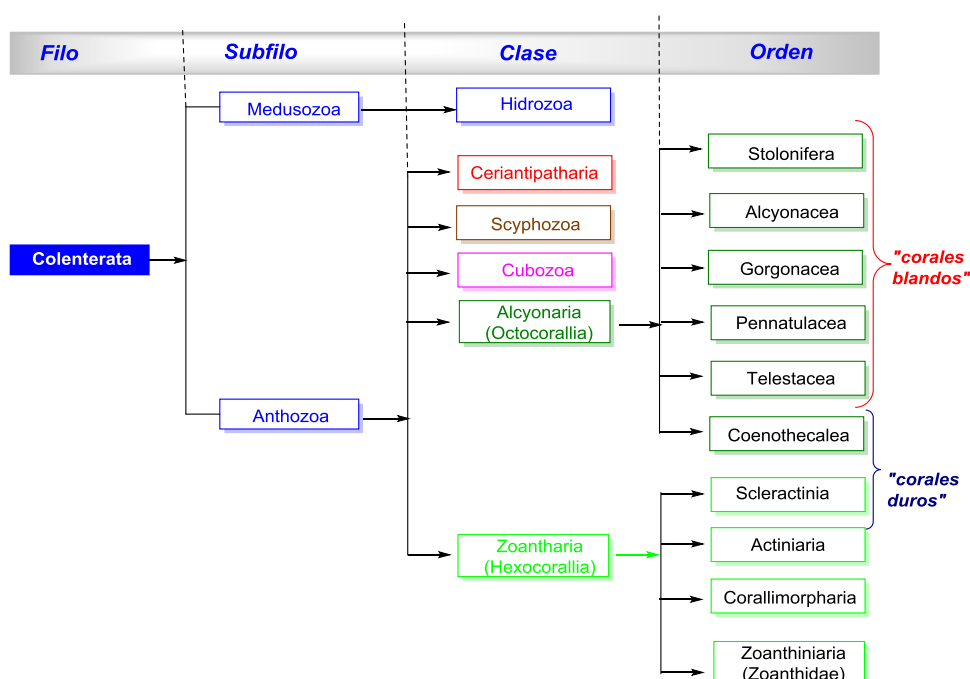


I.2.1 Estudio del coral blando *Briareum* sp.

Los corales blandos son invertebrados pertenecientes al filo Coelenterata (Cnidaria), subfilo Anthozoa, Clases Alcyonaria y Zoantharia. Son en general organismos coloniales, en algunos casos solitarios, que están formados por unidades básicas denominadas pólipos. El pólipo es esencialmente un tubo que se une a otros de la misma colonia mediante un sistema de canales que comunican sus bases. Cada pólipo presenta una abertura oral con un anillo de tentáculos que utiliza para capturar el alimento.

Los corales blandos han sido una fuente abundante de nuevos productos naturales con una gran diversidad de estructuras y marcadas actividades farmacológicas.²⁷⁹

Una breve clasificación taxonómica del filo se presenta en el Esquema 1. Si el número de tentáculos es ocho, los organismos pertenecen a la clase Octocorallia, y si es de seis, a la clase Hexacorallia.



Esquema 1. Clasificación de los octocorales

La clase Octocorallia está formada por los seis órdenes siguientes:²⁸⁰

Stolonifera

Poseen generalmente pequeños pólipos que están conectados entre sí por un atolón delgado. Una de las especies mas representativas pertenece al género *Tubipora*, también conocida como tubo de órgano, que se caracteriza por ser capaz de segregar carbonato de calcio y formar grandes colonias.

Alcyonacea

Generalmente son los denominados corales blandos. Algunas especies del género *Dendronephthya* son de colores brillantes y viven en aguas poco profundas del Pacífico. Otras especies pertenecen a los

²⁷⁹ Coll J. C. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 613.

²⁸⁰ Colin P. L., Arneson Ch. *Tropical Pacific Invertebrates*. The Coral Reef Press. Beverly Hills, California, USA, **1995**.

géneros *Sarcophyton*, *Litophyton* y *Sinularia*, llamados también corales gamuza. Estos últimos suelen ser oportunistas en colonizar sustratos, rápidos en establecer nuevos individuos y crecen rápidamente para cubrir toda el área disponible. Incluso cuando la competencia en los arrecifes de coral es muy grande, son capaces de crecer sobre corales duros.

Gorgonacea

Conocidos como abanicos marinos, tienen un esqueleto axial formado por un cuerno escleroprotéico llamado gorgonina. Pueden tener todo tipo de formas: de látigo, de abanico o de colonias de arbustos. Son a menudo de colores brillantes y suelen ser de aguas poco profundas. A esta clase pertenece el organismo *Briareum* sp. que se estudió en este capítulo.

Penatulacea

Estas plumas marinas son muy diferentes de las otras especies. Normalmente tienen un largo pólipo axial que se asocia con otros pólipos secundarios de los lados del tallo. La mayoría de ellos tienen un esqueleto que es un cuerno central (el lápiz) y sus tejidos están reforzados con espículas afiladas. Alguno de ellos, cuando son molestados de noche, muestran bioluminiscencia o parpadeos verde-azulados.

Telestacea

Son octocorales que tienen espículas calcáreas sobre la superficie de su cuerpo, sirviéndole de soporte y mantenimiento. La clasificación de las especies se hace por la talla de las espículas y lo afiladas que son. La mayoría de ellos filtran el agua para alimentarse fundamentalmente de zooplacton en habitats con corrientes marinas.²⁸¹ Algunos de los que viven en las aguas menos profundas, especialmente las amarronadas, se encuentran en simbiosis con algas dinoflageladas llamadas zooxanthellas. Estos simbioses llevan a cabo la fotosíntesis proporcionando un aumento de la entrada de nutrientes que intensifican la calcificación de los corales duros.

Coenothecalea

Son los octocorales denominados corales azules. Construyen un esqueleto calcificado de aragonita colaborando en la formación de los arrecifes.

En los últimos años se han publicado muchos estudios de corales blandos procedentes del mar Caribe,²⁸² habiendo muchos menos estudios de especies procedentes del Pacífico Sur. Nuestro equipo de investigación había publicado previamente algunos trabajos sobre gorgonias procedentes de los Arrecifes de Coral de Nueva Caledonia del Sur del Pacífico que muestran que estos organismos son capaces de biosintetizar compuestos de interés farmacológico. El ejemplo más ilustrativo fue el estudio de *Villogorgia rubra*, del cual se logró aislar, entre otros compuestos, dos nuevos alcaloides indólicos a los que denominamos villagorginas A y B. Uno de estos metabolitos, villagorgina A, mostró una importante actividad como antagonista de la acetilcolina.²⁸³

²⁸¹ Lewis J. L. *Zool.* **1982**, 196, 371.

²⁸² Rodríguez A. D. *Tetrahedron* **1995**, 51, 4571.

²⁸³ Espada A., Jiménez C., Debitus C., Riguera R. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 773.

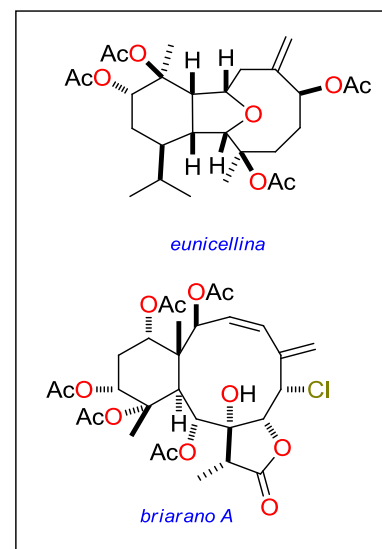
1.2.1.1 Antecedentes. Los esqueletos diterpénicos en los corales blandos

Numerosos estudios químicos han demostrado que los invertebrados marinos del filo Coelenterata, y particularmente de la subclase Octocorallia, constituyen la fuente natural más importante de cembranoides cíclicos.

Este tipo de compuestos se han encontrado tanto en abanicos, en látigos marinos del orden Gorgonacea, en corales blandos de los órdenes Alcyonacea y Stolonífera, así como en lápices de mar del orden Pennatulacea. En total se han identificado más de 600 compuestos nuevos, la mayoría encuadrados en nueve clases de esqueletos diterpenos.

Uno de los primeros compuestos aislados fue eunicellina, un diterpenoide carbocíclico aislado de la gorgonia del Mediterráneo *Eunicella stricta*, cuya estructura fue publicada en 1968.²⁸⁴

Al mismo tiempo, se descubrieron otros terpenoides en la gorgonia *Briareum asbestinium* que contenían átomos de cloro.^{285,286} Pero no fue hasta 1977 cuando se resolvió, mediante difracción de rayos X, la estructura del primer compuesto que ha dado nombre a este tipo de esqueleto, el briarano A.



El aislamiento de estos compuestos fue el inicio del descubrimiento de un gran grupo de esqueletos diterpénicos. Debido a su procedencia biogenética a partir de cembrano, los diterpenos del tipo briarano, cladiellina y asbestinina se consideran cembranoides cíclicos (ver Figuras 13 y 14).^{287,288}

Los nombres empleados para denominar estos cembranoides ciclados de origen marino son distintos dependiendo del criterio que se seleccione (Figura 13). Así, algunos autores emplean el de briarano o briareno teniendo en cuenta la ciclación a través de un átomo de oxígeno que contiene el esqueleto (**A** en Figura 13).^{289,290,291} Otros los nombran en función del esqueleto carbonado (por ejemplo, esqueleto **B** en Figura 13).²⁹² En el caso de la asbestinina, se tienen en cuenta los cicloéteres presentes en el esqueleto de **C**, mientras que para el asbestinano sólo se tiene en cuenta el esqueleto carbonado del esqueleto **D**.^{293,294}

²⁸⁴ Kennard O., Watson D. G., Riva Di Sanseverino L., Tursch B., Bosmans R., Djerassi C. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 2879.

²⁸⁵ Hyde R. W. *Thesis*. University of Oklahoma, **1966**.

²⁸⁶ Bartholomé C. *Thesis*. University Libre de Bruxelles, **1974**.

²⁸⁷ Erdtman H., Norin M., Sumimoto M., Morrison A. *Tetrahedron Lett.* **1964**, 3879.

²⁸⁸ Karlsson B., Pilotti A., Soderholm C., Norin T., Sumdin S., Sumimoto M. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2349.

²⁸⁹ Stierle D., Carté B., Faulkner D. J., Tagle B., Clardy J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5088.

²⁹⁰ Ravi B. N., Marwood J. F., Wells R. J. *Aus. J. Chem.* **1980**, *33*, 2307.

²⁹¹ Bowden B. F., Coll J. C., Patalinghug W., Skelton B. W., Vasilescu I., White A. H. *Aus. J. Chem.* **1987**, *40*, 2085.

²⁹² Shin J., Park M., Fenical W. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1633.

²⁹³ Selover S. J., Crews P., Tagle B., Clardy J. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 964.

²⁹⁴ Morales J., Lorenzo D., Rodríguez A. D. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1368.

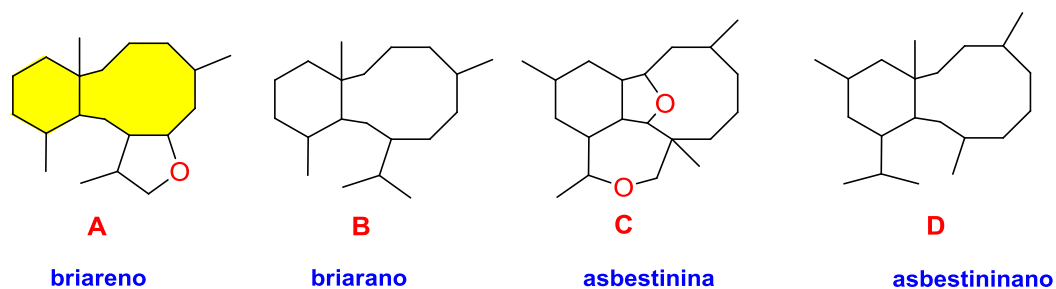
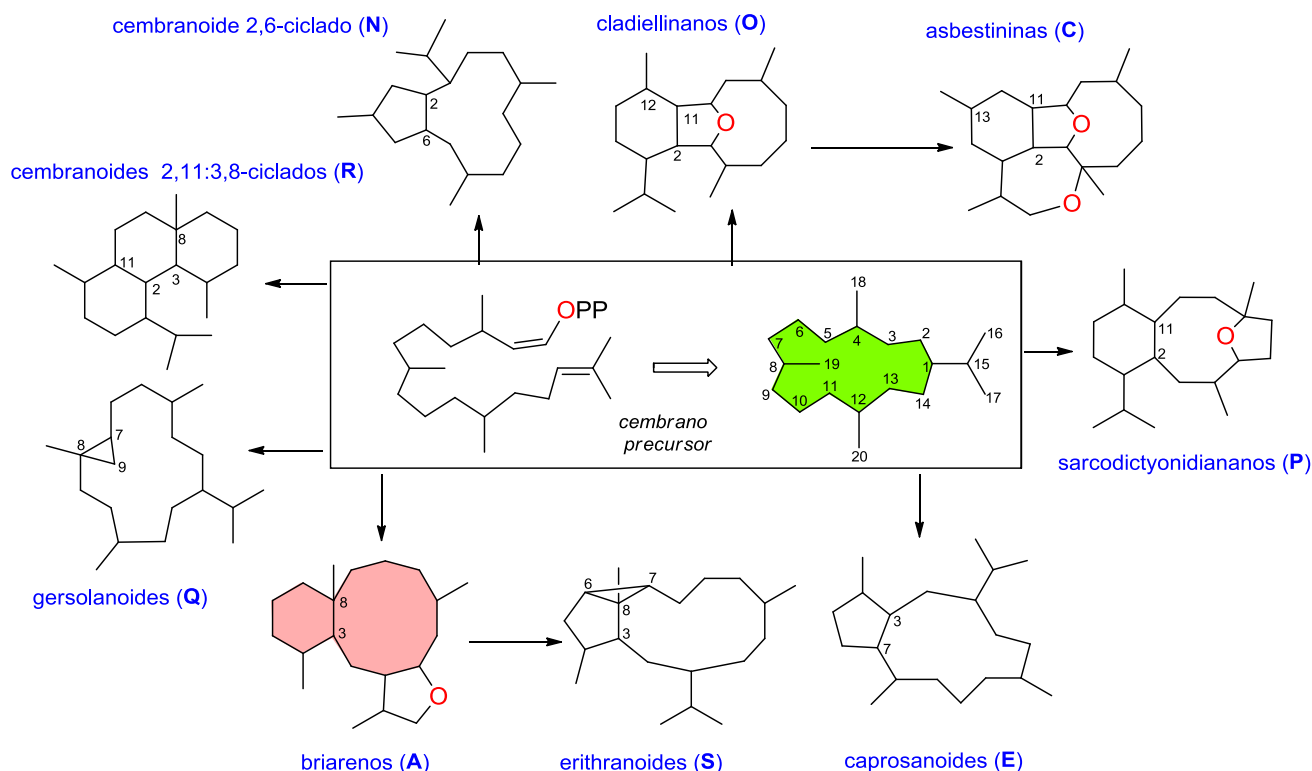


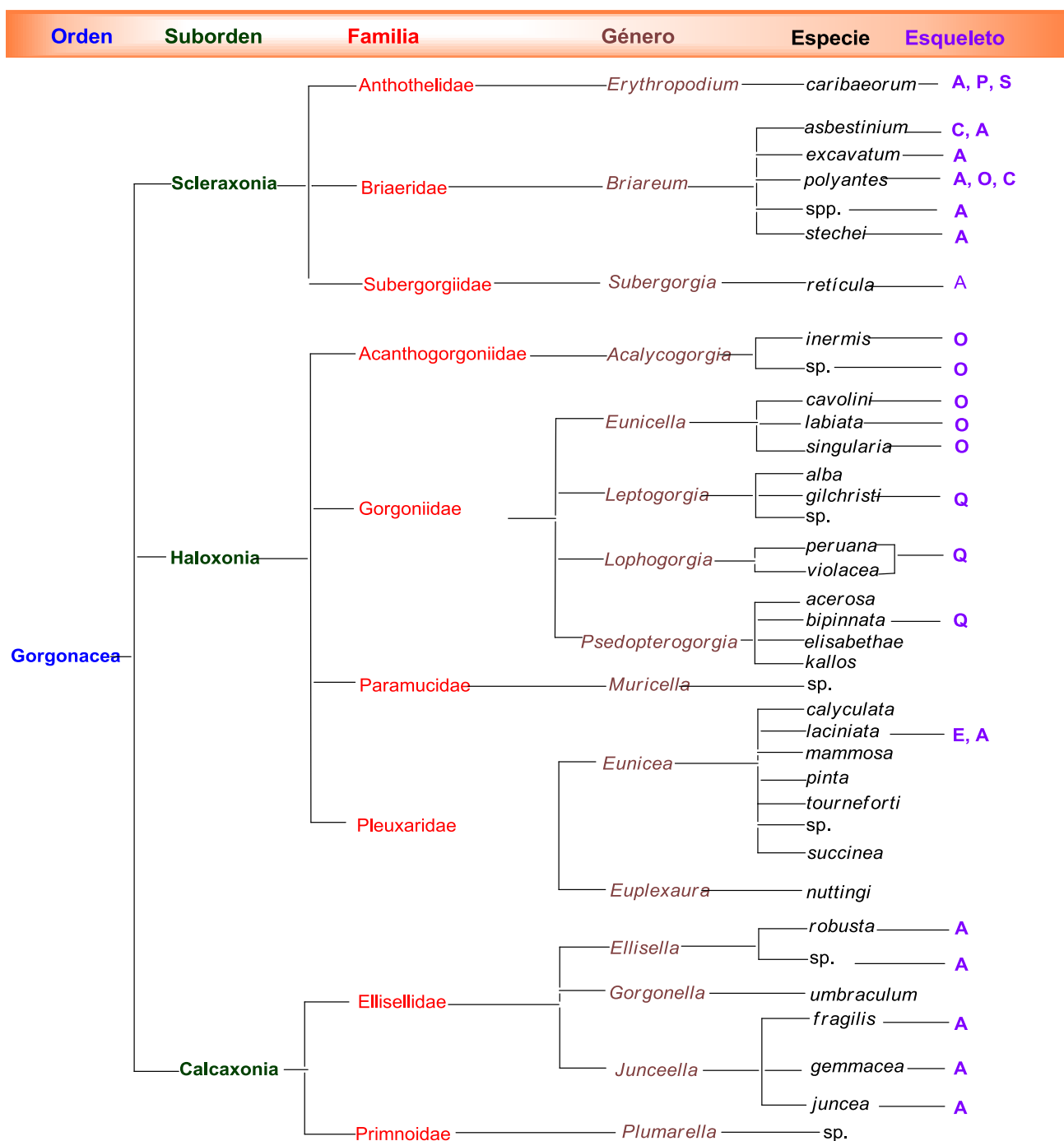
Figura 13. Algunos tipos de esqueletos de cembranoides cíclicos.

En el Esquema 2 se muestra la ruta biogénica que Faulkner y colaboradores propusieron para estos diterpenos a partir de un cembrano precursor.²⁸⁹



Esquema 2. Propuesta biogénica de los cembranoides diterpénicos cíclicos a partir del cembrano.

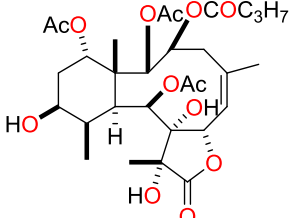
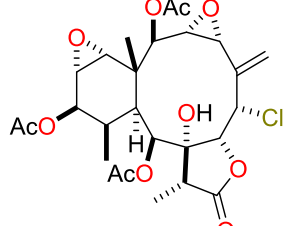
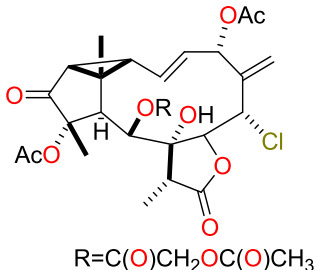
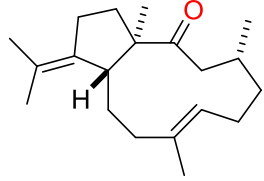
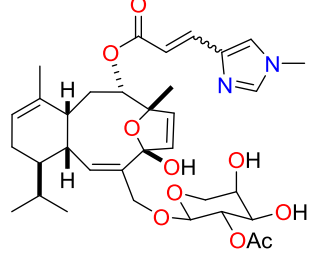
Este tipo de esqueletos son muy frecuentes en compuestos aislados de gorgonias, dando origen a un gran número de estructuras nuevas, exhibiendo muchas de ellas diferentes tipos de actividades biológicas. Dentro del orden Gorgonacea (ver Esquema 3) existen familias, como las Briareidae, las Gorgoniidae y las Pleuxaridae, que han demostrado una gran capacidad de producir además otros tipos de productos naturales, entre los que cabe destacar: esteroides, acetogeninas y sesquiterpenos. En el Esquema 3 se puede ver una relación entre las especies estudiadas y los tipos de cembranoides cíclicos diterpénicos de los compuestos aislados, siguiendo la nomenclatura descrita en el Esquema 2.



Esquema 3. Cladograma (diagrama de la clasificación taxonómica) del orden de la Gorgonacea y tipos de cembranoides cíclicos diterpénicos de los compuestos aislados.

En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de compuestos aislados correspondientes a los esqueletos descritos, así como las actividades biológicas que mostraron algunos de ellos.

Tabla 3. Ejemplos de diterpenos aislados de gorgonias y tipos de esqueletos, descritos en el Esquema 2, a los que pertenecen.

Nombre del compuesto	Organismo	Familia	Actividad	Estructura	Tipo de esqueleto	Ref.
Brioexcavatolido L	<i>Briareum excavatum</i>	Briareidae	Células P-388 (EC ₅₀ 0.5 µg/mL)		A	295
Solenolido D	<i>Briareum</i> sp.		Contra las larvas de mosca (ED ₁₀₀ 30-35 ppm) antiinflamatorio antivírico (virus Semiliki Forest y Arbor)		A	296
Erytrolido L	<i>Erythropodium caribaeorum</i>	Anthothelidae		 R=C(O)CH ₂ OC(O)CH ₃	S	297
Dollabellano	<i>Eunicea laciniata</i>	Plexauridae			E	298
Desmetil eleutherobina	<i>Erythropodium caribaeorum</i>	Anthothelidae	Antimitótico (IC ₅₀ 20 nM)		P	299 300

²⁹⁵ Sung P., Su J., Duh C., Chiang M. Y., Sheu J. J. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1415.

²⁹⁶ Groweiss A., Look S. A., Fenical W. J. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 2401.

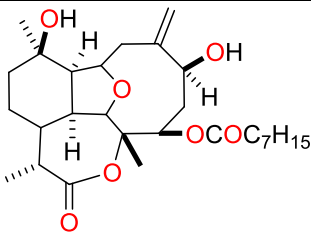
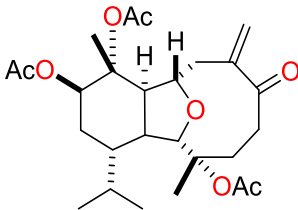
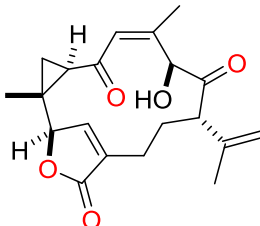
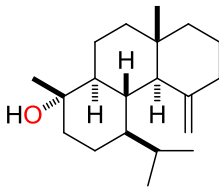
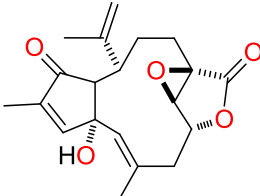
²⁹⁷ Banjoo D., Mootoo B. S., Ramsewak R. S., Sharma R., Lough A. J., McLean S.: Reynolds F. W., *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 314.

²⁹⁸ Rodríguez A. D., González E., González C. J. *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 226.

²⁹⁹ Cinel B., Roberge M., Behirish H., van Ofwegen L., Castro C. B., Andersen R. J. *J. Org. Lett.* **2000**, 2, 257.

³⁰⁰ Roberge M., Cinel B., Anderson H. J., Lim L., Jiang X., Xu L., Bigg C. M., Kelly M. T., Andersen R. J. *Cancer Res.* **2000**, 60, 5052.

Tabla 3. Ejemplos de diterpenos aislados de gorgonias y tipos de esqueletos, descritos en el Esquema 2, a los que pertenecen (continuación).

Nombre del compuesto	Organismo	Familia	Actividad	Estructura	Tipo de esqueleto	Ref.
Briallerina A	<i>Briareum asbestinium</i>	Briareidae			C	301
Labiatina B	<i>Eunicella labiata</i>	Gorgoniidae	Antitumoral (HCT-116, ED ₅₀ =0.85 μg/mL)		O	302
Pinnatina	<i>Pseudo-pterogorgia bipinnata</i>	Gorgoniidae	Antitumoral frente a un panel de líneas celulares tumORAles		Q	303
Isopropil-1, 8α-dimetil -5-metilen tetradecahidro fenantren-1-ol	<i>Briareum</i> sp.				R	304
Coralloidolido F	<i>Alcyonium</i> sp	Alcyoniidae			N	305

³⁰¹ Rodríguez A. D., Cobar O. M. *Tetrahedron* **1995**, 51, 6869.

³⁰² Ortega M. J., Zubia E., Salvá J. J. *Nat. Prod.* **2005**, 68, 614.

³⁰³ Rodríguez A. D., Shi J. G., Huan S. D. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4425.

³⁰⁴ Bowden B. F., Coll J. C., Vasilescu I. M. *Aus. J. Chem.* **1989**, 42, 1705.

³⁰⁵ D'Ambrosio M., Guerriero A., Pietra F. *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 804.

I.2.1.2 Estudio químico de *Briareum* sp.

I.2.1.2.1 Identificación y clasificación

El coral blando *Briareum* sp. fue recolectado por el Pr. Jaime Rodríguez en las islas Togian, en Sulawesi (Indonesia) durante el curso de una expedición científica organizada por el grupo de investigación del Pr. Phillip Crews de la Universidad de Santa Cruz (California) en la primera quincena de Octubre del año 1995.

Codificado con el código JR9524, la identificación taxonómica de este coral blando fue realizada por el Dr. Ramil Blanco del Departamento de Recursos Naturais e Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Vigo. Es de destacar que los géneros *Briareum* y *Solenopodium* han sido unificados bajo el género *Briareum*.^{306,307}



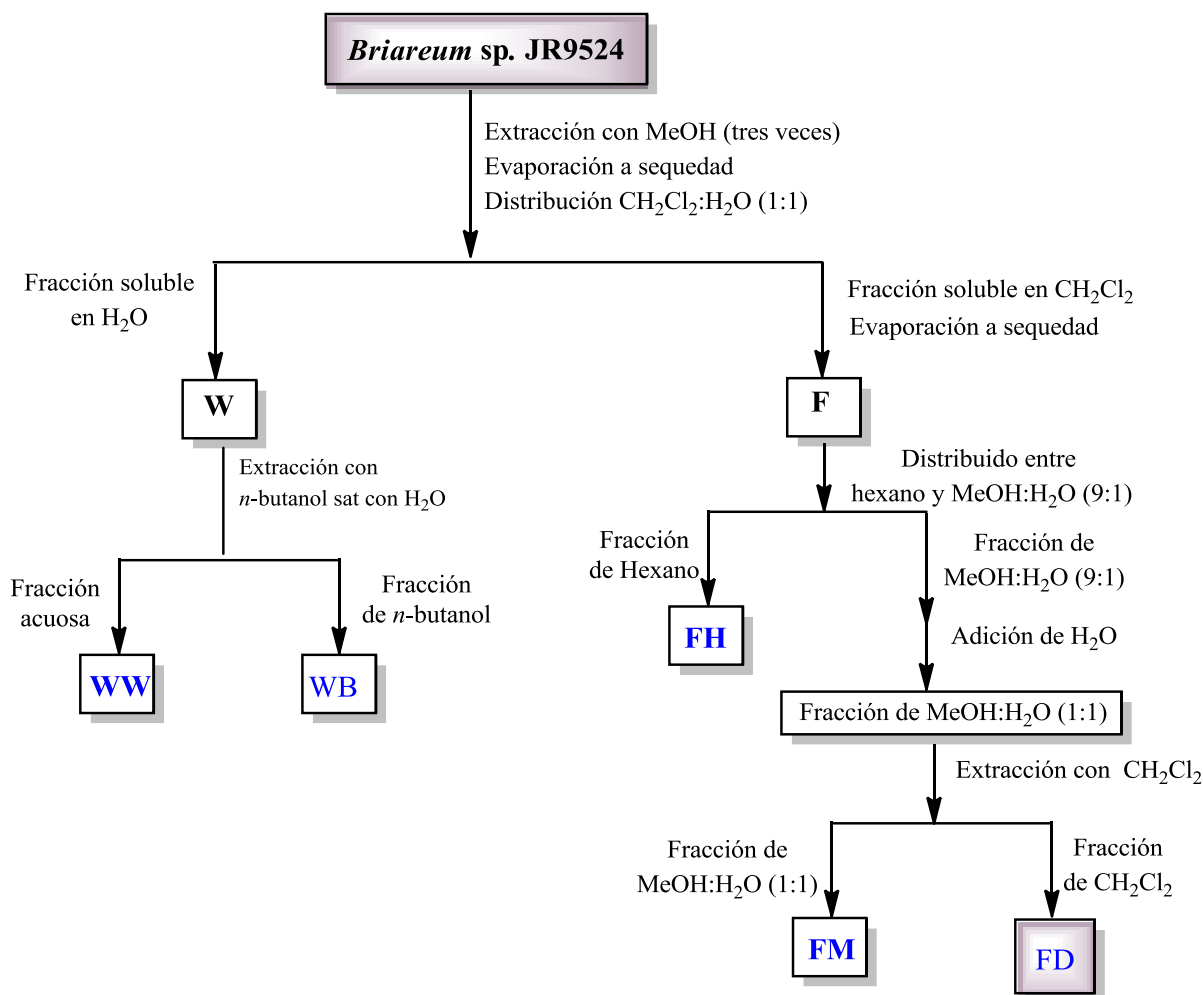
Figura 14. Fotografía del coral blando *Briareum* sp. objeto de este estudio.

³⁰⁶ Bayer, F. M. *Proc. Biol. Soc. Wash.* **1981**, 94, 902.

³⁰⁷ González N., Rodríguez J., Kerr R. G., Jiménez C. J. *Org. Chem.* **2002**, 67, 5117.

1.2.1.2.2 Extracción y fraccionamiento

Con el fin de extraer todos los metabolitos secundarios, este coral blando fue cortado en pequeños trozos, extrayéndose posteriormente repetidas veces con metanol. El extracto metanólico se fraccionó entre distintas mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad, aprovechándose así el distinto coeficiente de reparto que presentan los componentes de los extractos orgánicos en cada uno de los sistemas de disolventes (ver Esquema 4).



Esquema 4. Esquema de fraccionamiento del extracto metanólico del coral blando *Briareum sp.*

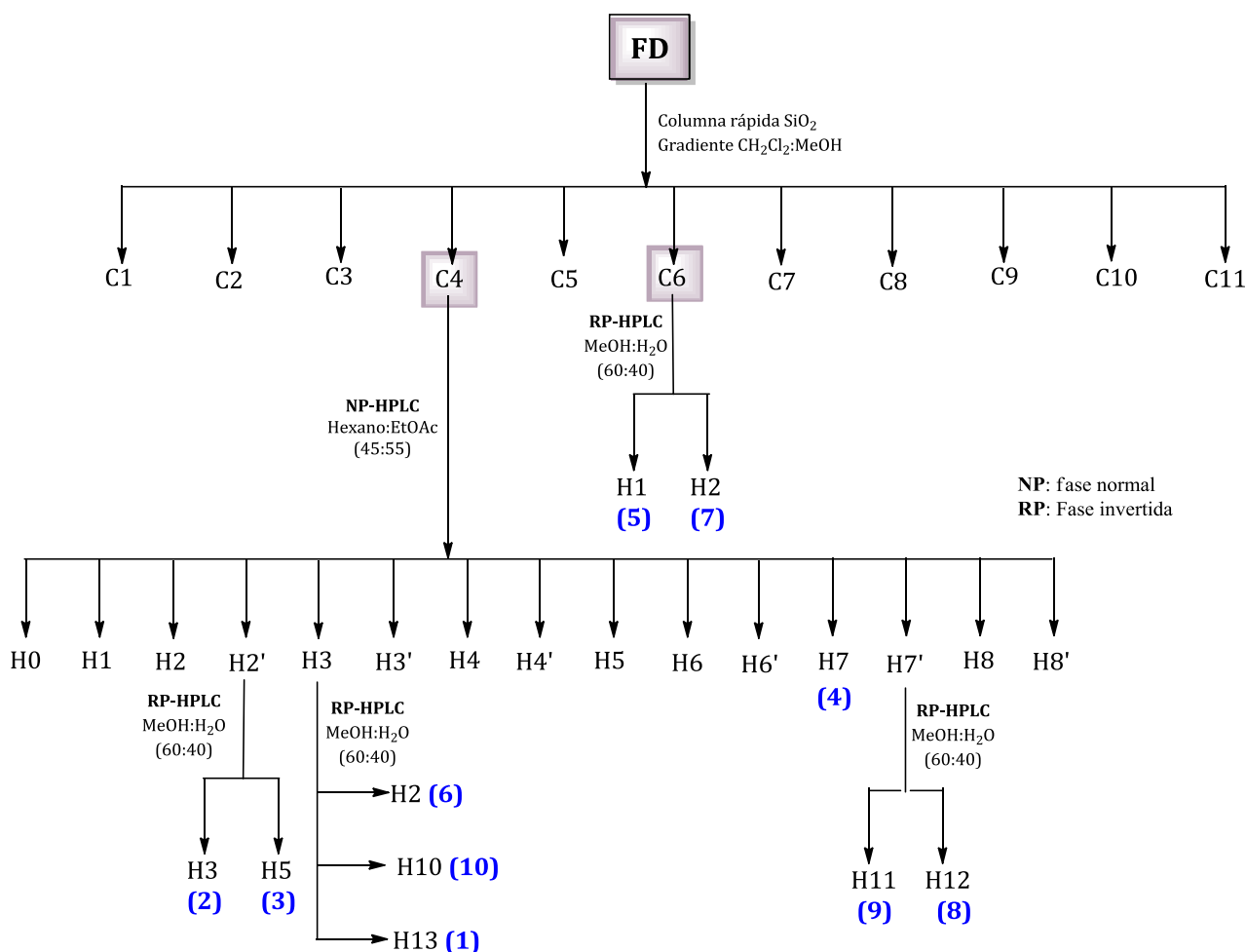
El extracto metanólico se concentró a presión reducida y a continuación se redisolvió entre diclorometano y agua (1:1), obteniéndose dos fracciones: una fracción soluble en agua, denominada W, y una fracción soluble en diclorometano (F). Una vez evaporado el disolvente, los compuestos solubles en diclorometano se distribuyeron entre hexano y metanol, al cual se le adicionó un 10% de agua para generar dos fases. Se obtuvo de este modo una fracción de hexano (FH) y una fracción de compuestos solubles en metanol al 90%. A esta última fracción se le adicionó agua hasta obtener una composición del 50% de MeOH/H₂O, que se extrajo con diclorometano para dar dos nuevas fracciones, una denominada FM, con compuestos más polares, y otra denominada FD, con compuestos de menor polaridad.

La elección de las fracciones que resultaron, *a priori*, más interesantes para su estudio se hizo en función de los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la fracción de hexano (**FH**) mostraron la presencia de esteroides, por lo que se decidió no estudiarse. Sin embargo, la fracción de diclorometano denominada **FD** mostró en su espectro de RMN de ^{13}C desplazamientos químicos interesantes entorno a 172 y 77 ppm, por lo que se procedió a su posterior separación.

I.2.1.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción de diclorometano **FD** se separó inicialmente en una columna rápida de gel de sílice, obteniéndose dos fracciones, la C4 y C6, que resultaron ser las más interesantes por RMN. Dichas fracciones se sometieron a sucesivas separaciones por cromatografía líquida de alta eficacia, para dar los compuestos puros **1-10**, tal como se indica en el siguiente Esquema 5:



Esquema 5. Esquema de aislamiento de los compuestos **1-10** de la fracción de diclorometano **FD**.

I.2.1.2.4 Determinación estructural

En la Figura 15 se muestran los metabolitos aislados e identificados en el estudio del coral blando *Briareum* sp. La elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo utilizando diversas técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensionales y espectrometría de masas FAB en modo ion positivo.

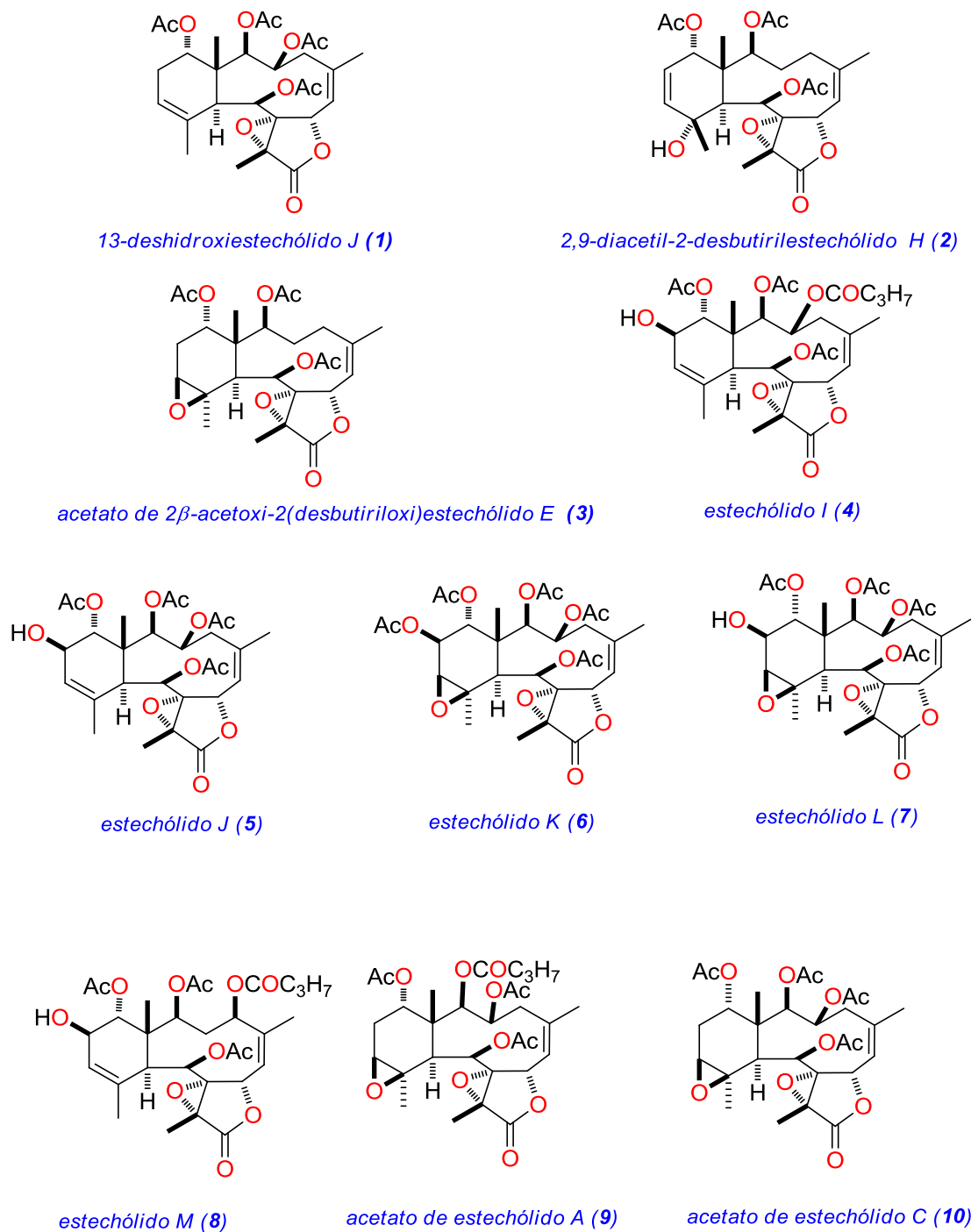


Figura 15. Compuestos aislados del coral blando *Briareum* sp.

1.2.1.2.4.1 13-Deshidroiestechólido **1**.

La purificación de la fracción **FDC4H3H13** mediante HPLC usando una columna de fase invertida μ -Bondapak C_{18} con MeOH:H₂O al 40%, nos permitió aislar, con un t_R de 49.09 min empleando un flujo de 1 mL/min, el compuesto **1**. Después de eliminar el disolvente, se obtuvo como un polvo blanco con una rotación óptica específica de $[\alpha_D] -19.2^\circ$ (CH₂Cl₂ c 0.05).

En el espectro de masas FAB modo ión positivo (ver Figura 16) se detectaron los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ a m/z 549 y $[M+Na]^+$ a m/z 571, concordante con la fórmula molecular C₂₈H₃₆O₁₁, que fue confirmada en su espectro de masas de alta resolución.

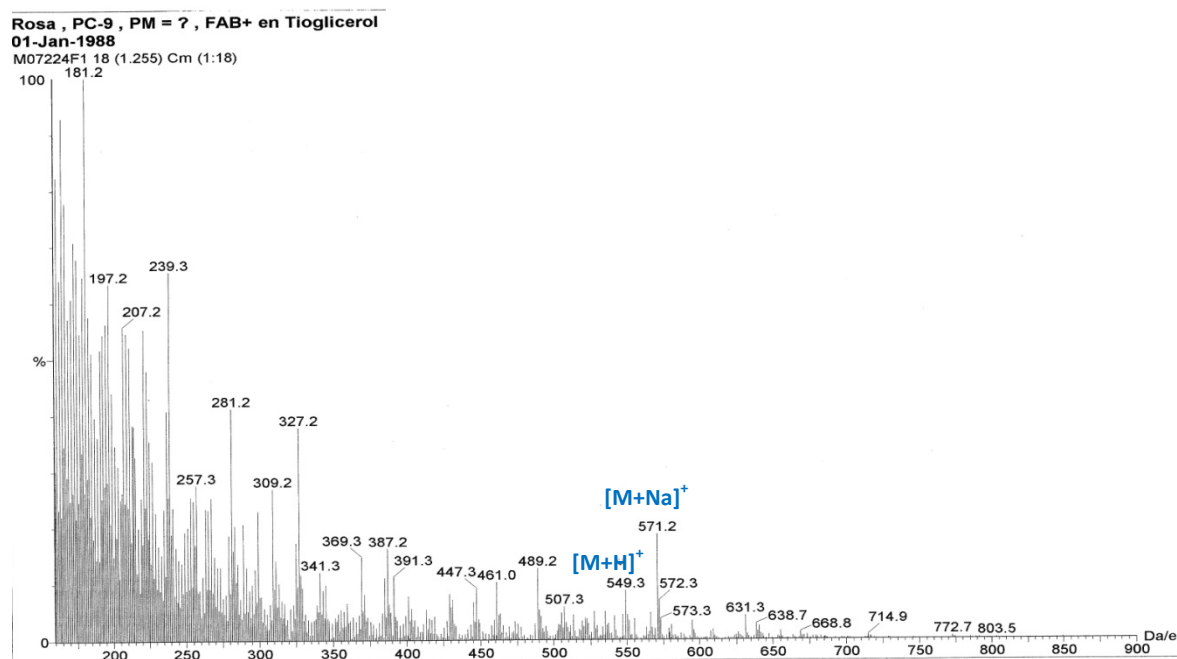


Figura 16. Espectro de masas (+)-FAB (matriz tioglicerol) del compuesto **1**.

El espectro de RMN de carbono, junto con el espectro DEPT-135 (Figura 18), sirvió para calcular la fórmula APT como C₂₈H₃₆ al observarse 10 carbonos cuaternarios, 8 terciarios (6 sp^3 y 2 sp^2), 2 secundarios y 8 grupos metilo.

La presencia de cuatro grupos acetato se confirmó por las cuatro señales singuletes correspondientes a cuatro metilos en el espectro de RMN de ¹H (ver Figura 17) a δ_H 2.23, 2.13, 1.99 y 1.98 (3 protones cada una). La existencia de dos dobles enlaces trisustituídos se dedujo a partir de los desplazamientos químicos a δ_C 142.5 (s), 121.6 (d), 130.9 (s) y 122.1 (d), y de dos protones olefínicos a δ_H 5.40 (da, 1H) y 5.49 (sa, 1H).

Mediante su espectro bidimensional ¹H-¹H COSY (Figura 20) se pudo deducir la presencia de los cuatro sistemas de espín **A**, **B**, **C** y **D** mostrados en la Figura 19.

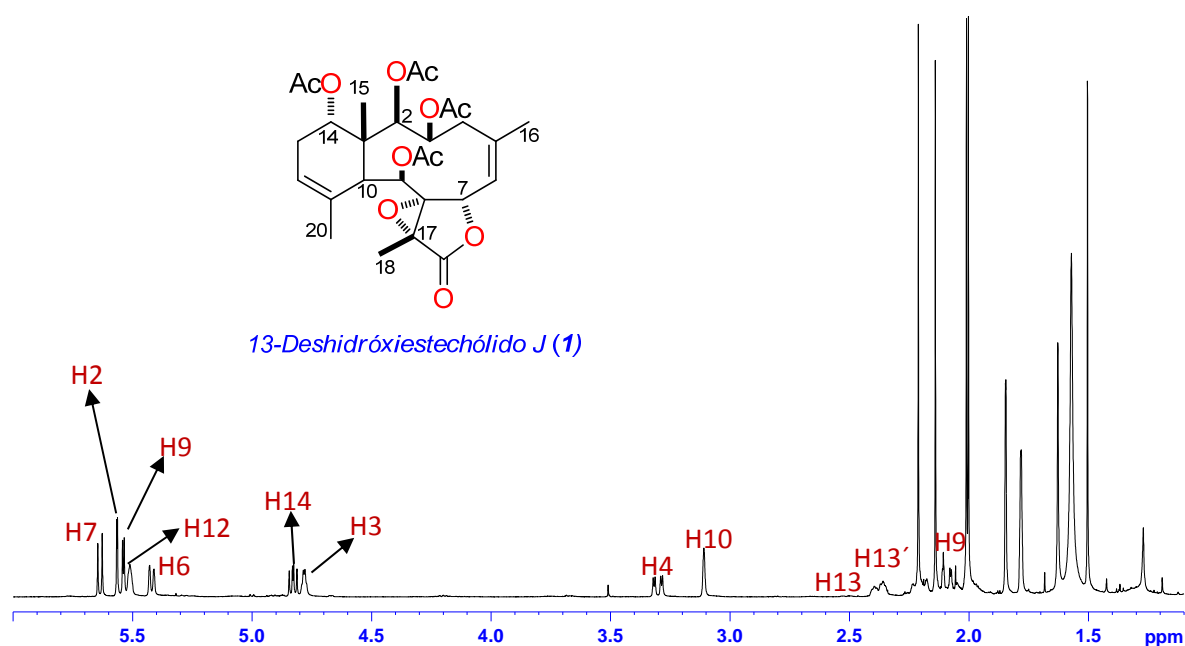


Figura 17. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) del compuesto 1.

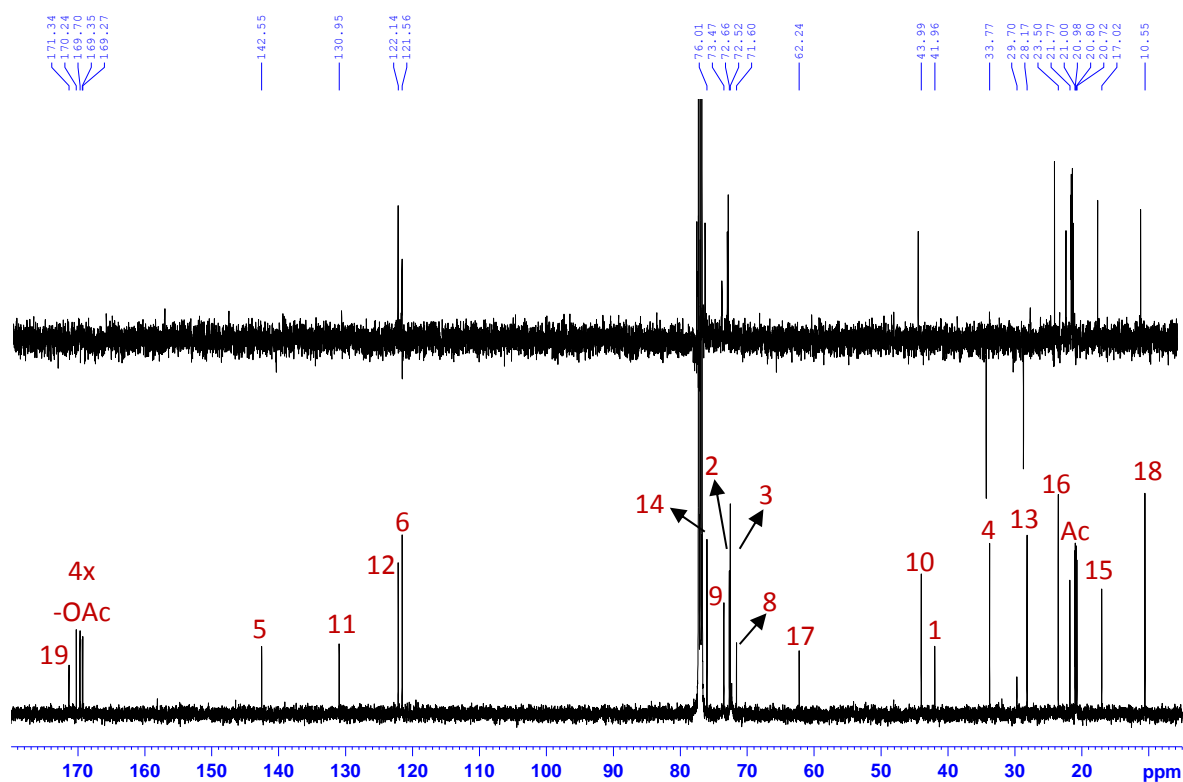


Figura 18. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz) del compuesto 1.

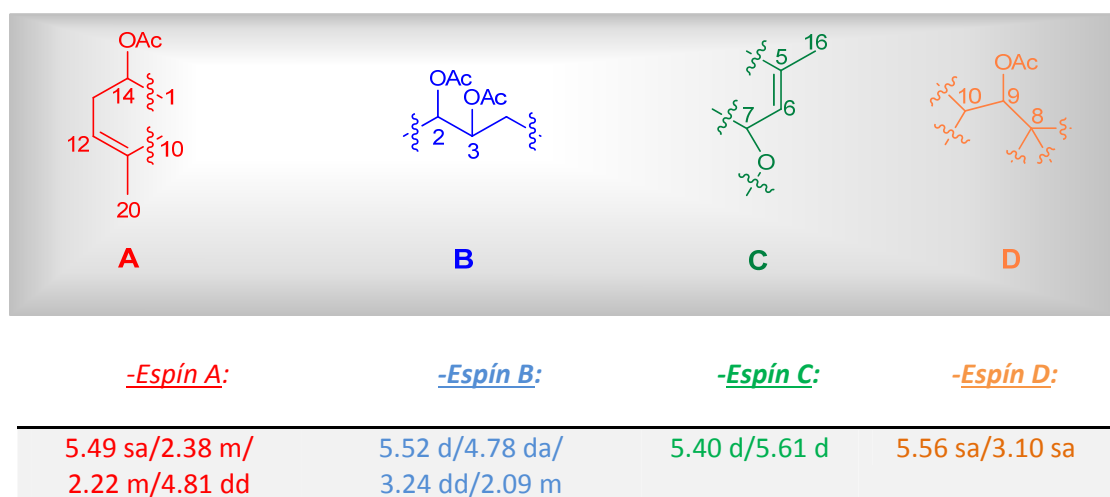


Figura 19. Sistemas de espín A, B, C y D deducidos del espectro RMN bidimensional ^1H - ^1H COSY compuesto 1.

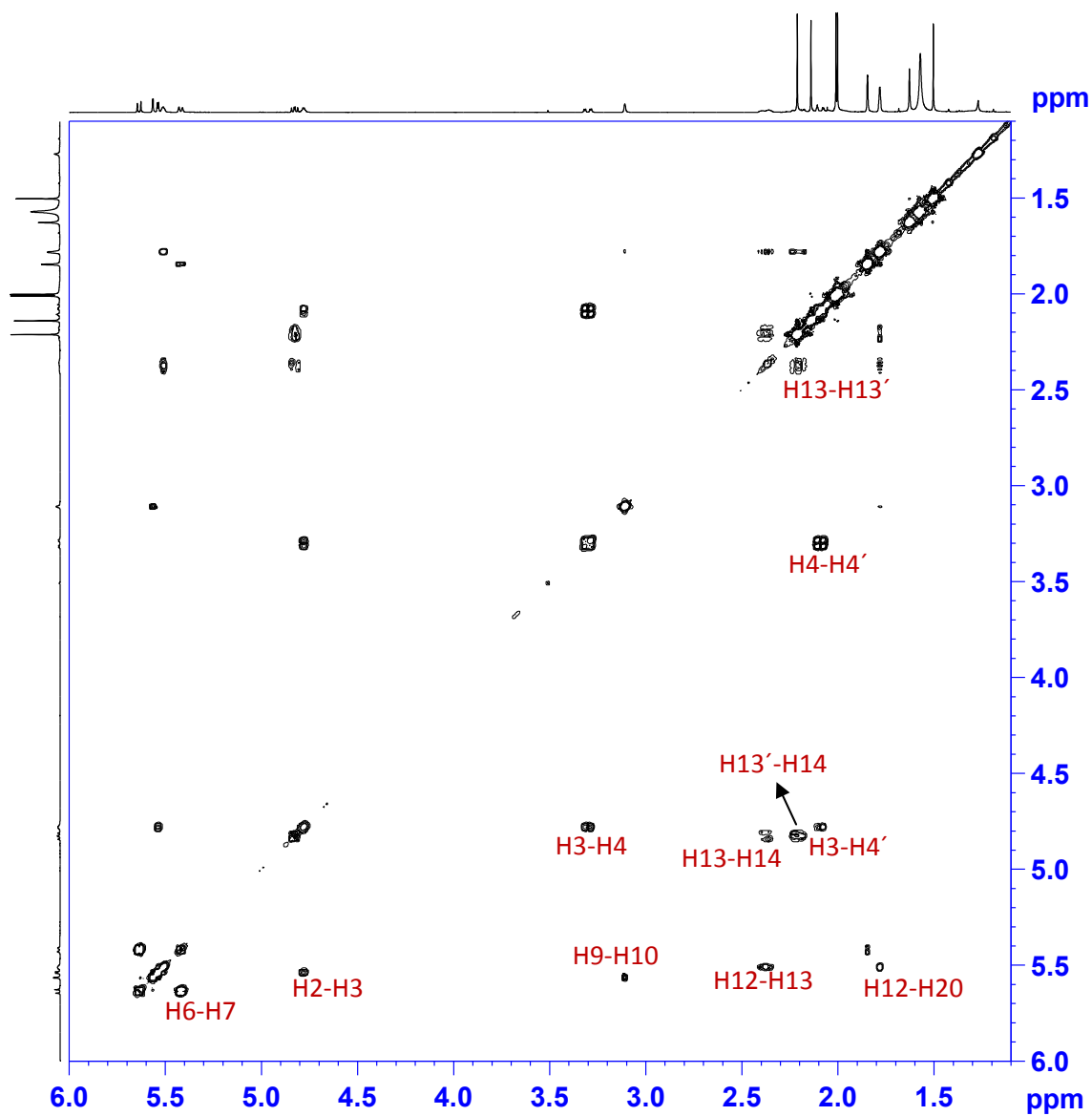


Figura 20. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 1.

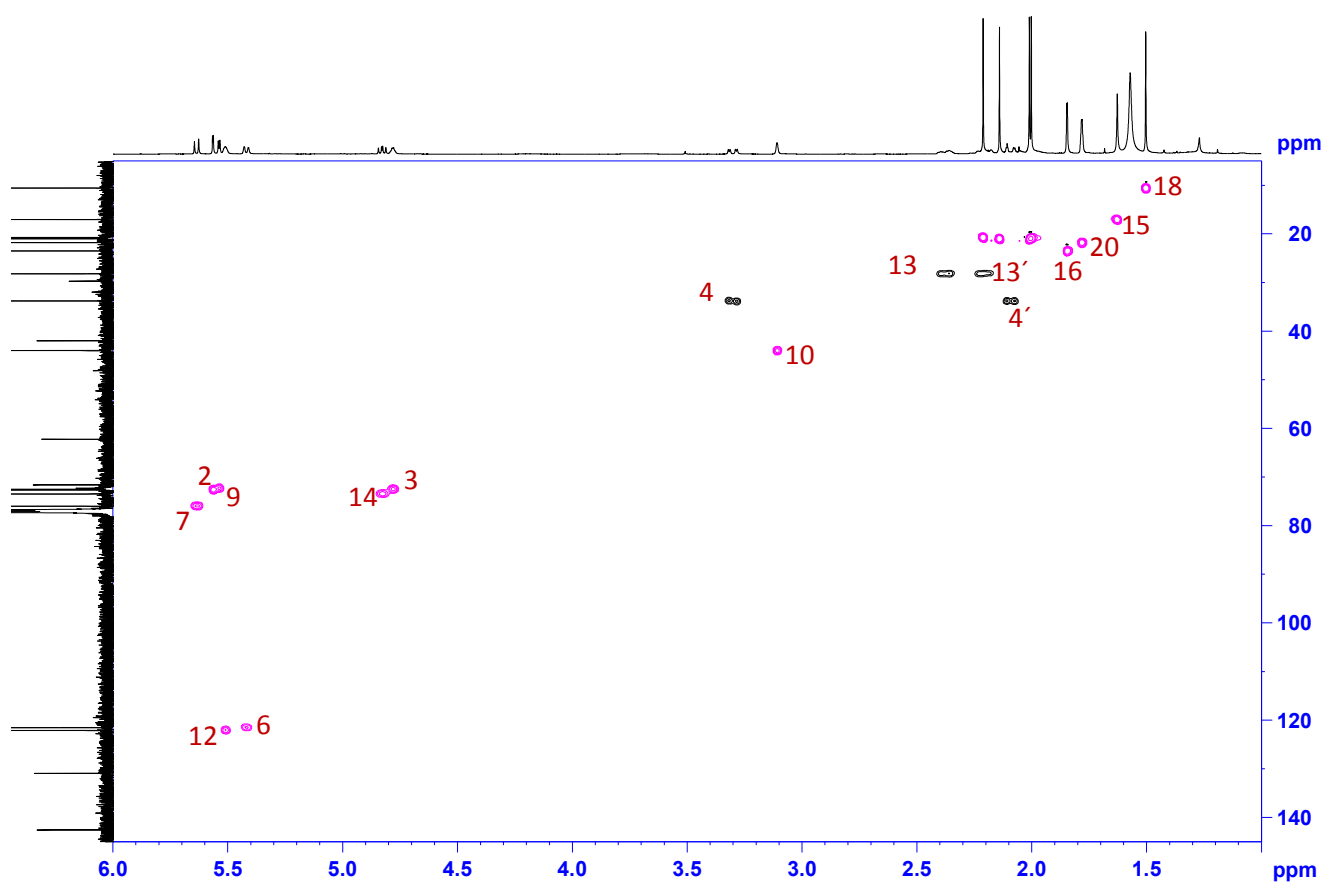


Figura 21. Espectro HSQC-editado (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 1. Cortes de nivel de color negro son grupos metileno.

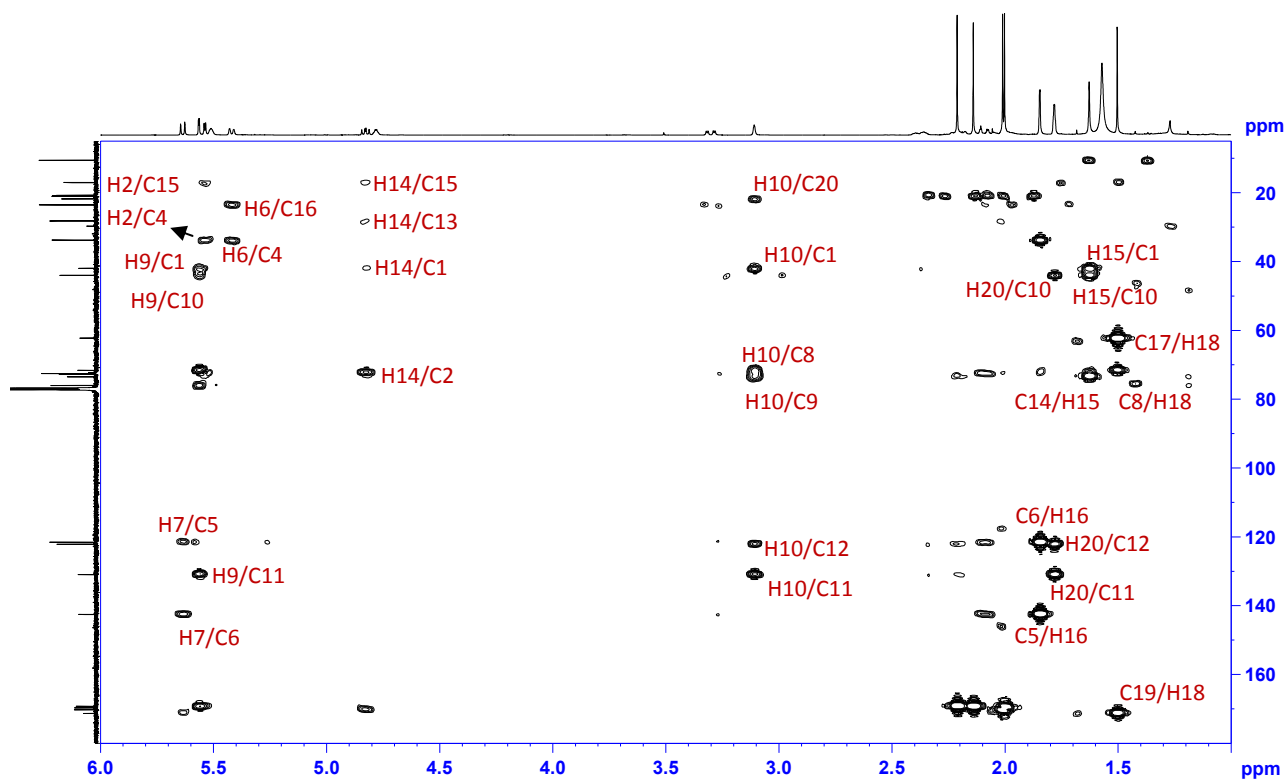


Figura 22. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 1 y correlaciones más importantes observadas.

Cada carbono fue conectado con sus protones unidos directamente mediante el experimento de correlación ^{13}C - ^1H -HSQC editado (ver Figura 21).

Una vez deducidos los sistemas de espín, se enlazaron a través de los carbonos cuaternarios de la molécula mediante un experimento HMBC (ver Figura 22) que mostró las correlaciones indicadas en la Figura 23.

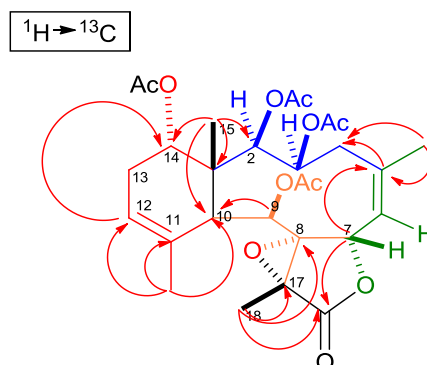


Figura 23. Correlaciones clave ^1H - ^{13}C a larga distancia observadas en el espectro HMBC de **1**.

Por último, se compararon los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto **1** con los de otros diterpenos publicados de briaranos.³⁰⁸ Dicha comparación mostró que los datos eran muy similares a los de estechólido **J** (**5**),³⁰⁹ diferenciándose únicamente en la ausencia del grupo hidroxilo del carbono 13, y a los de 2,3,14-triacetoxi-8,17-epoxi-9-hidroxibriara-5,11-dien-19-ona,³⁰⁸ deduciéndose que el compuesto **1** era el derivado acetilado de dicho compuesto.

La comparación de los datos espectroscópicos de **1** con los de los dos compuestos mencionados anteriormente indicó que poseían además la misma estereoquímica relativa. Esto pudo confirmarse a través del experimento NOESY del compuesto **1** (Figura 25) al mostrar correlaciones nOe (ver Figura 24) entre el Me18 y el protón H7, entre el metilo 15 y el protón H14, entre los protones H10, H9, H2 y H3, indicando que estos están en el mismo lado del anillo de ciclodecano y entre el protón H13 y el metilo 15 indicando que los grupos OAc en 14 y el metilo en 15 están en lados diferentes del esqueleto de briarano.

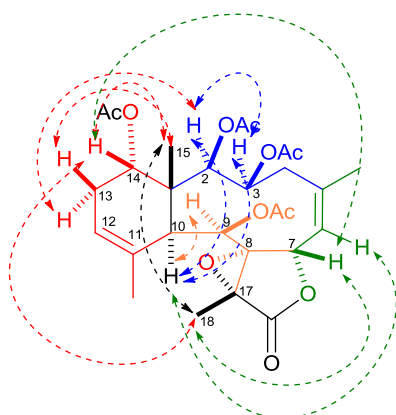


Figura 24. Correlaciones dipolares observadas en el experimento NOESY (ver Figura 25) del compuesto **1**.

³⁰⁸ Bodwen B. F., Coll J. C., Vasilescu I. M. *Aust. J. Chem.* **1989**, 42, 1705.

³⁰⁹ Schmitz F.J., Shulz M.M., Siripitayanon J., Hossain M.B. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 1339

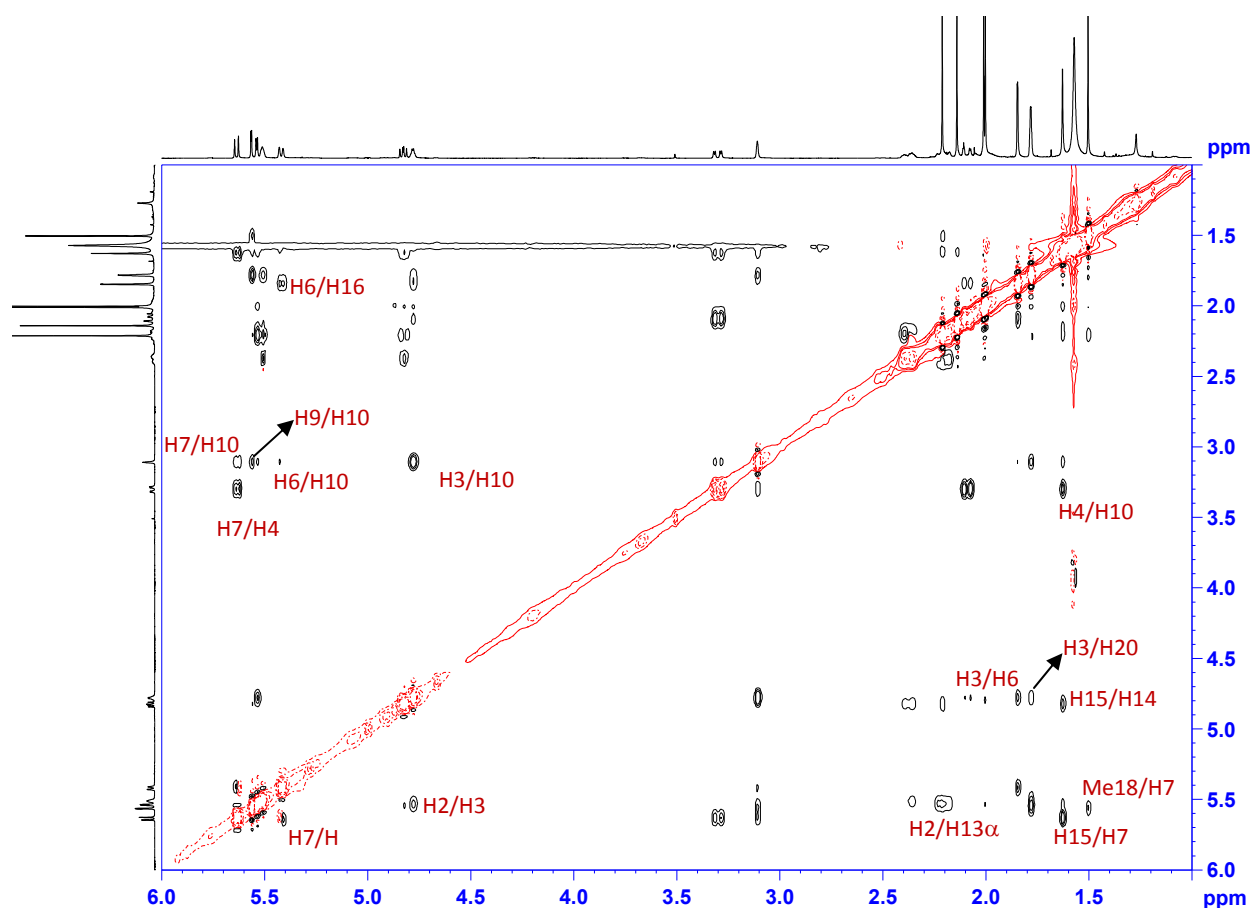


Figura 25. Espectro de ^1H - ^1H NOESY (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **1**.

Estudios de modelización molecular usando el módulo GMMX³¹⁰ del programa PCMODEL sobre el compuesto **1**, mostraron la presencia de dos conformeros mayoritarios de baja energía con estructuras tridimensionales muy parecidas, denominando **1a** al conformero más estable y conformero **1b** que presenta una energía MMX 1.5 Kcal/mol mayor. En estos dos conformeros se observó que el sistema bicíclico ciclodeceno-ciclohexano tiene dos disposiciones diferentes con ángulos dihedros entre los carbonos C9-C10-C1-C2 de 88.9° en el **1a** y de 144.3° en el **1b**. En ambos conformeros, el doble enlace Δ^5 se encuentra próximo al puente de unión ciclohexeno-ciclodeceno (Figura 26). Este plegamiento inusual explica las correlaciones nOe entre los protones H2/H13 α (δ_{H} 5.52/2.22) y H6/H10 (δ_{H} 5.40/3.10) observadas en el espectro de NOESY de **1**, además de confirmar la proximidad entre Δ^5 y H10. Por otro lado, la disposición ortogonal (ángulo de torsión aproximadamente de 90°) de los protones H2 y H3 que se observa en esas conformaciones, concuerda con la pequeña constante de acoplamiento ($J = 1.8$ Hz) (Tabla 4) y el nOe observado entre esos dos protones en el espectro RMN de ^1H y el espectro NOESY de **1**, respectivamente.

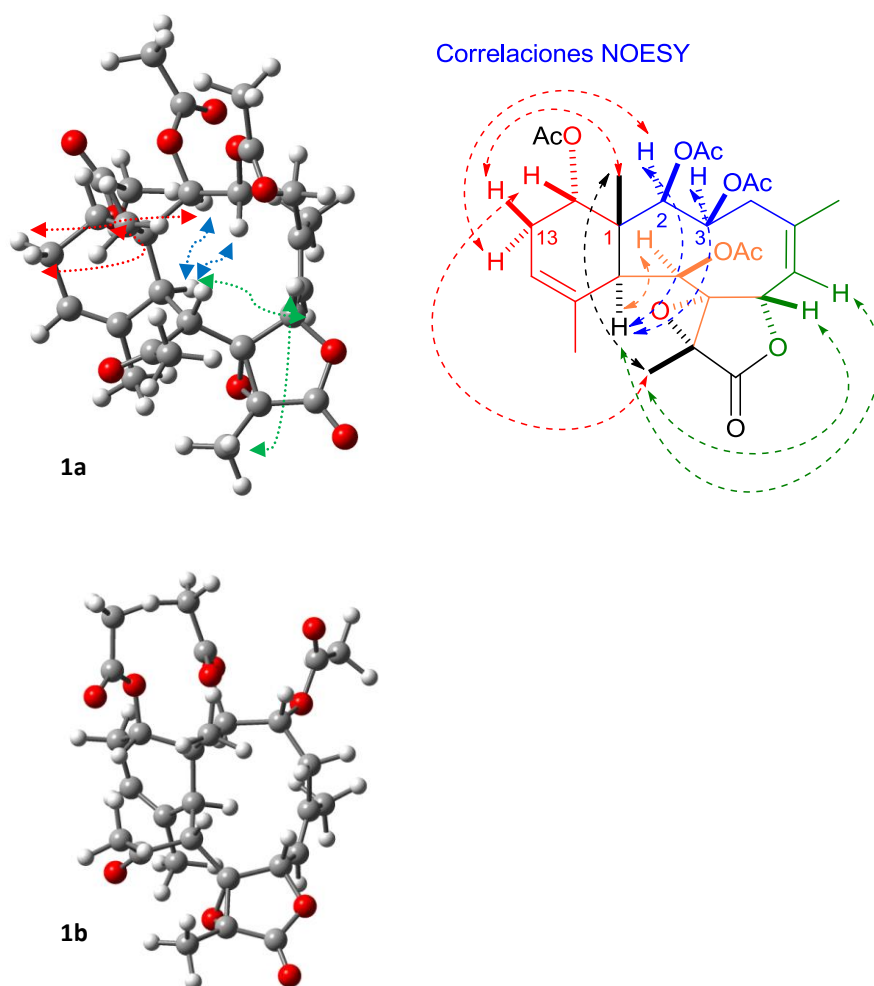
³¹⁰ PCMODEL (Versión 9.3). Serena Software para PC. Este cálculo se hizo con la versión 7.0.

Tabla 4. Valores de las constantes de acoplamiento (J) experimentales y calculadas para los conformeros **1a** y **1b**.

		1a		1b		
	$J_{\text{experimental}}$	$J_{\text{calculado}}$	Ángulo dihedro	$J_{\text{calculado}}$	Ángulo dihedro	J_{promedio}^1
H2-H3	1.8	3.2	-110.1	7.4	161.4	3.43
H6-H7	9.1	11.2	167.6	11.0	164.6	11.2
H9-H10	<1.5	0.6	98.1	2.6	87.9	<1.6

¹ Se tuvo en cuenta la proporción de poblaciones mediante la distribución de Boltzman

Estos datos espectrales resultaron ser muy similares a los de algunos briaranos, como los estechólidos I-N aislados de *Solenopodium (Briareum) excavatum*,³¹¹ y a los de los briareólidos, aislados por Bodwen y col.³⁰⁸ Así, el compuesto **1** resultó ser otro ejemplo adicional en el que la disustitución 2β , 3β es fundamental para conseguir esta inusual conformación. La ausencia de un grupo OH en disposición β en C13 en el compuesto **1** demuestra que no es necesaria para que adapte esa conformación, aunque su presencia la favorece.



Conformeros **1a** (arriba) y **1b**, 1.5 kcal/mol menos estable (abajo) y nOe observados

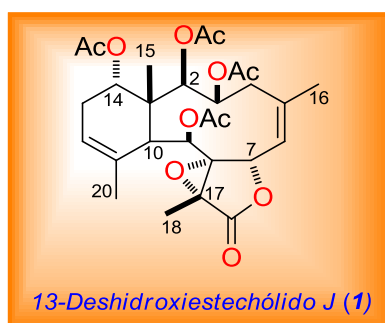
Figura 26. Conformeros de menor energía encontrados en el análisis conformacional GMMX del compuesto **1**.

³¹¹ Bloor S.J., Schmitz F. J., Hossain M. B., van der Helm D. J. *Org. Chem* **1992**, 57, 1205.

Todos estos datos indicaron que el compuesto **1** se trata de un nuevo producto natural que no había sido descrito en la bibliografía. Con el fin de ser coherentes con la nomenclatura de estos briaranos, el compuesto **1** se denominó 13-deshidroiestechólido J.

13-Deshidroiestechólido J (**1**) no mostró ninguna actividad antitumoral en los ensayos realizados en la empresa Biomar S. A. líneas celulares tipo P-388, A-549, HT-29 y MEL-28 a concentraciones menores de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 5. Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C de 13-deshidroiestechólido J (**1**).



Posición	δ_{H} (ppm), mult. J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	42.0d
2	5.52 d 1.8	72.7 d
3	4.78 da 1.8	72.6 d
4/4'	3.24 dd 15.5, 3.5 /2.09	33.8 t
5	-	142.6 s
6	5.40 da 9.1	121.6 d
7	5.61 d 9.1	73.5 d
8	-	71.6 s
9	5.56 sa	72.7 s
10	3.10 sa	44.0 d
11	-	130.9 s
12	5.49 sa	122.1 d
13/13'	2.38 m/2.22 m	28.2 t
14	4.81 dd 8.7 6.6	76.0 d
15	1.62 s	17.0 q
16	1.86 sa	23.5 q
17	-	62.2 s
18	1.52 s	10.5 q
19	-	171.3 s
20	1.78 sa	20.7 q
-OCOCH ₃	-	169.3 s/169.6 s/169.9 s/170.2 s
-OCOCH ₃	2.23 s/2.13 s/1.99 s/1.98 s	20.7 q/20.9 q/21.7 q/23.5 q

1.2.1.2.4.2 2,9-Diacetil-2-desbutirilesterehólido **2**

Este compuesto se aisló en forma de polvo blanco a partir de la fracción **FDC4H2'H3** al ser purificada mediante HPLC con un tiempo de retención de HPLC de 33.48 min empleando condiciones de fase invertida, flujo de trabajo 1 mL/min y una mezcla binaria compuesta por MeOH/H₂O (6:4) como fase móvil. Presentó una rotación específica $[\alpha] -69.8^\circ$ (Cl₂CH₂ c 0.05).

En su espectro de masas de ionización FAB en modo ión positivo (ver Figura 27) se observaron los iones pseudomoleculares a m/z 529 $[M+Na]^+$ y m/z 507 $[M+H]^+$, que se correspondían con la fórmula molecular C₂₆H₃₄O₁₀. El espectro de masas FAB en alta resolución del ion pseudomolecular $[M+H]^+$ confirmó dicha fórmula molecular de la que se dedujo que este compuesto poseía 10 grados de insaturación.

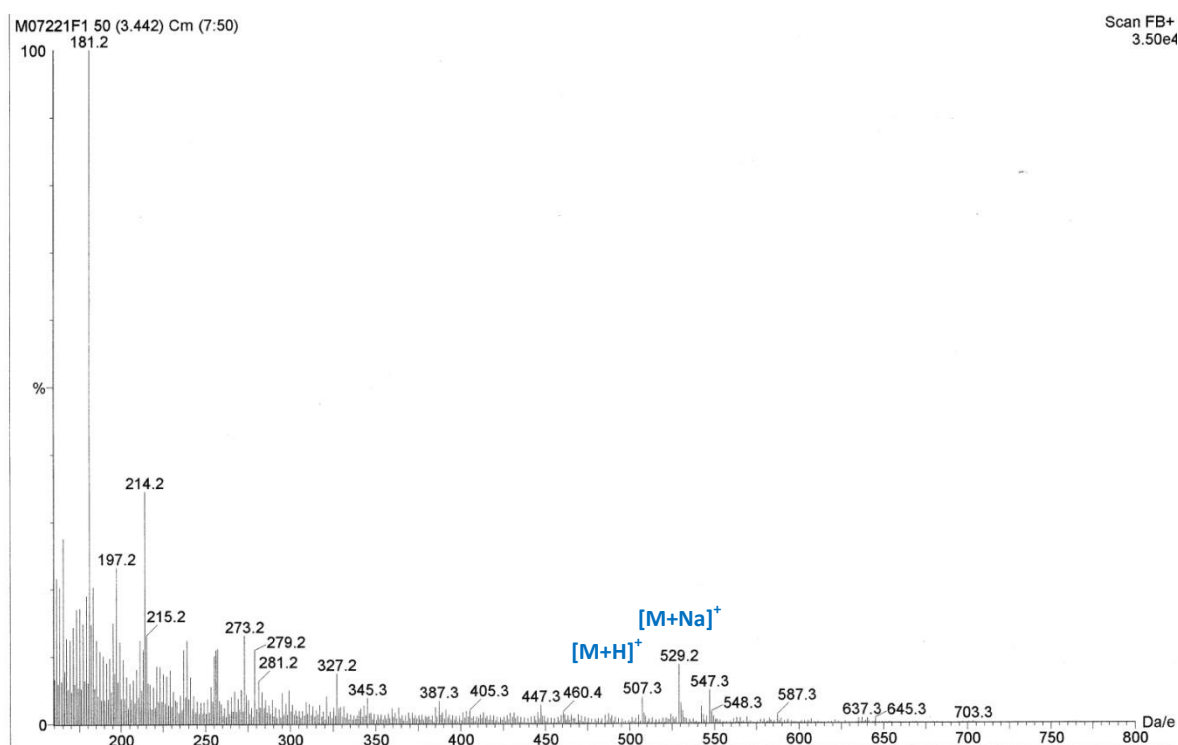
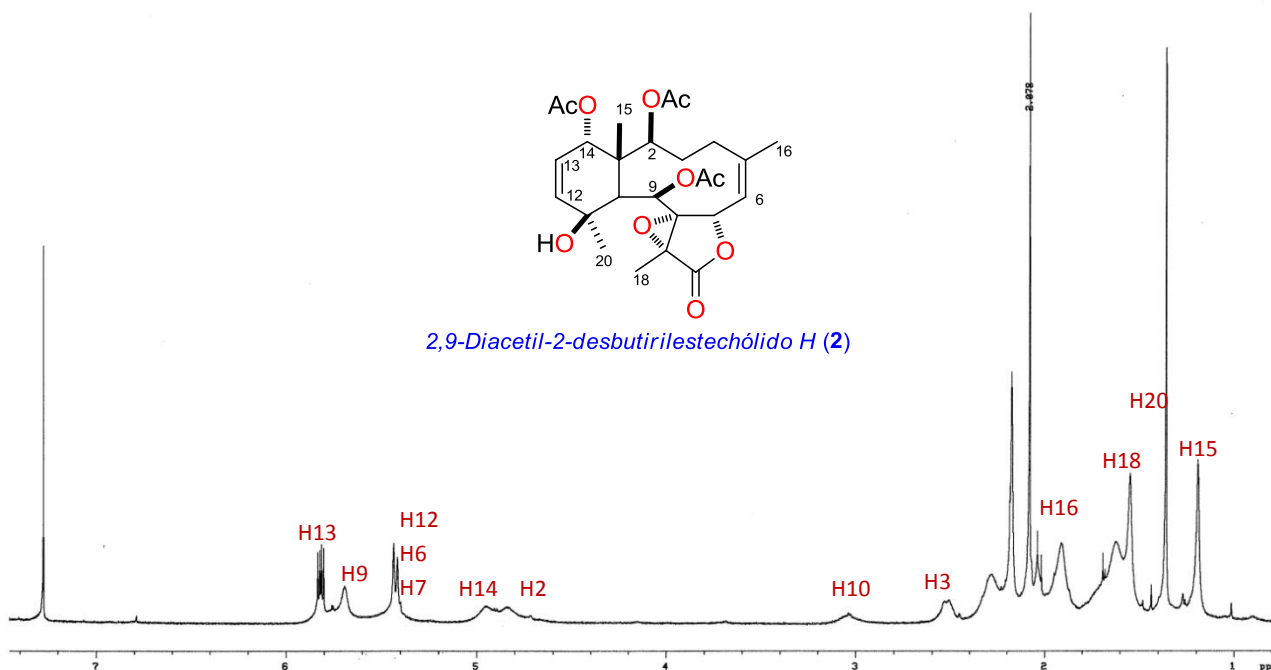
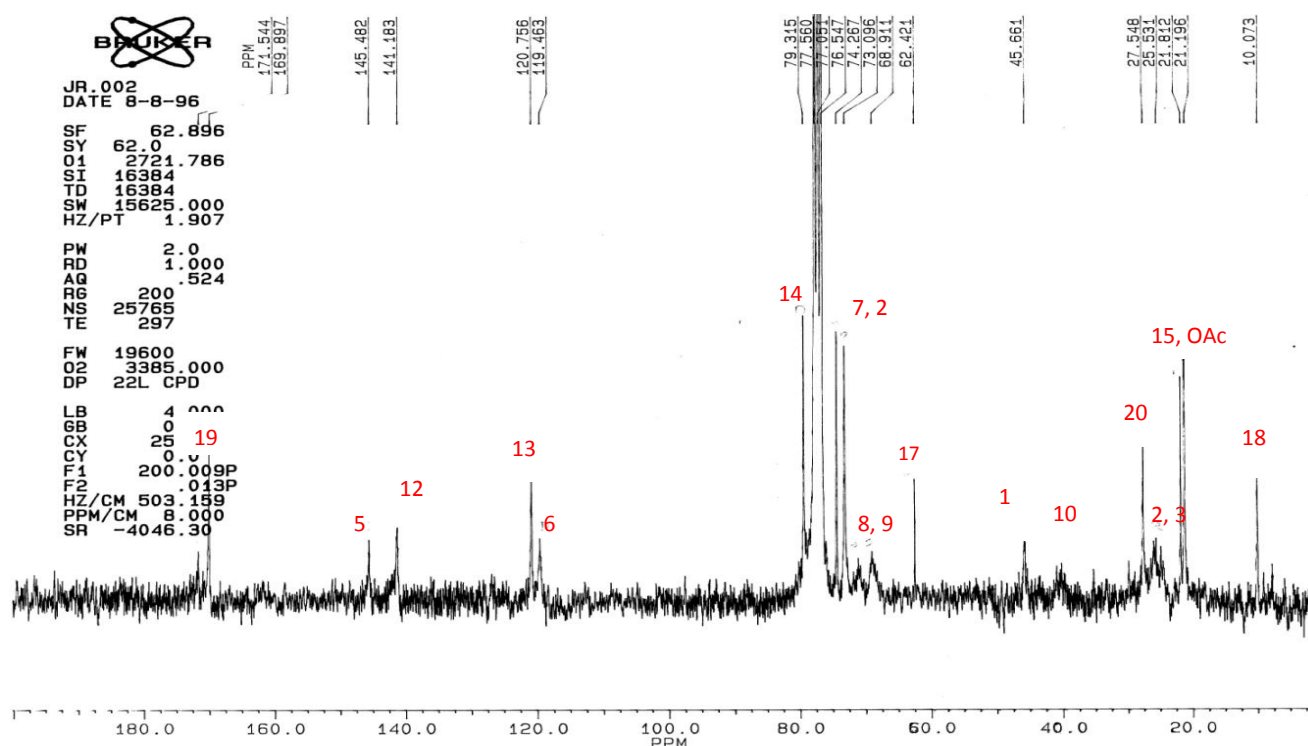


Figura 27. Espectro de masas (+)-FAB del compuesto **2**.

El espectro de RMN de ¹H del compuesto **2** (Figura 28) mostró señales muy ensanchadas, por lo que fue de gran ayuda el espectro de RMN HSQC editado por su DEPT-135, que nos permitió correlacionar todos los protones con los carbonos a los que se encuentran unidos directamente (Figura 32). Con este experimento bidimensional, junto con el espectro RMN de ¹³C, se pudieron deducir los siguientes fragmentos:

- La presencia de 3 grupos metilos a δ_H 2.07 (6H) y 2.25 (3H), correspondientes a grupos acetato.
- Otros tres grupos metilos a δ_H 1.57 (s, 3H), 1.42 (s, 3H) y 1.24 (s, 3H), unidos a carbonos cuaternarios.
- Un metilo vinílico que resuena como una señal ancha a δ_H 1.85 (3H).

En dicho espectro de RMN de ¹H (Figura 28) se observan también las señales correspondientes a tres protones vinílicos a δ_H 5.82 (dd, $J = 10.2$ y 5.6 Hz), 5.40 (da) y 5.41 (sa, 1H) y las de cuatro señales anchas a δ_H 3.03 (1H), 4.86 (1H), 4.95 (1H) y 5.66 (1H), asignándose las tres últimas con las resonancias de protones metínicos unidos a los tres grupos acetato mencionados anteriormente.


 Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 2

 Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C (62.3 MHz, CDCl_3) del compuesto 2.

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 2 se observó la presencia de cuatro carbonos olefínicos a δ_c 119.5 d, 120.7 d, 141.2 d y 145.5 s (Figura 29) correspondientes a dos dobles enlaces y de carbono carbonílicos de los grupos acetato y de una γ -lactona a δ_c 169.9 y 171.5, respectivamente. La presencia de un anillo de epóxido se dedujo por las resonancias de carbonos cuaternarios a δ_c 62.4 y 68.9. Con el fin de

completar los diez grados de saturación, deducida a partir de la fórmula molecular $C_{26}H_{34}O_{10}$, el compuesto debe de tener tres ciclos.

Los espectros de RMN bidimensionales 1H - 1H COSY (Figura 31), junto con el mencionado espectro HSQC editado de la Figura 32, fueron cruciales para deducir los sistemas de espín que hemos denominado A-F, que se muestran en la Figura 30.

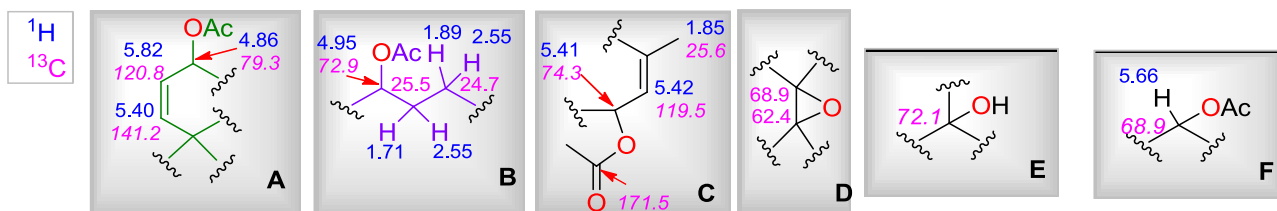


Figura 30. Sistemas de espín deducidos mediante los espectros 1H - 1H COSY y HSQC editado para el compuesto 2.

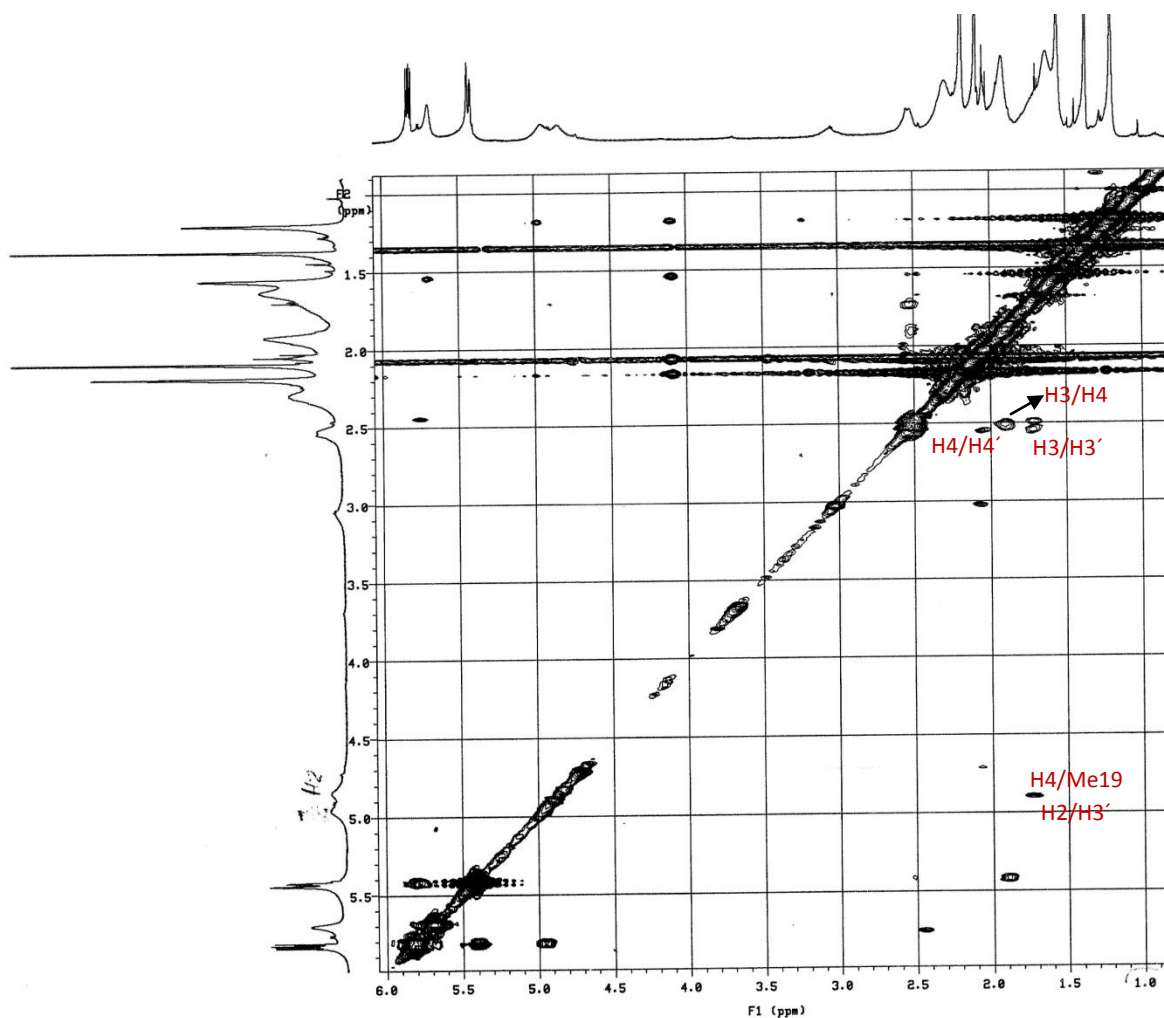


Figura 31. Espectro 1H - 1H COSY (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto 2.

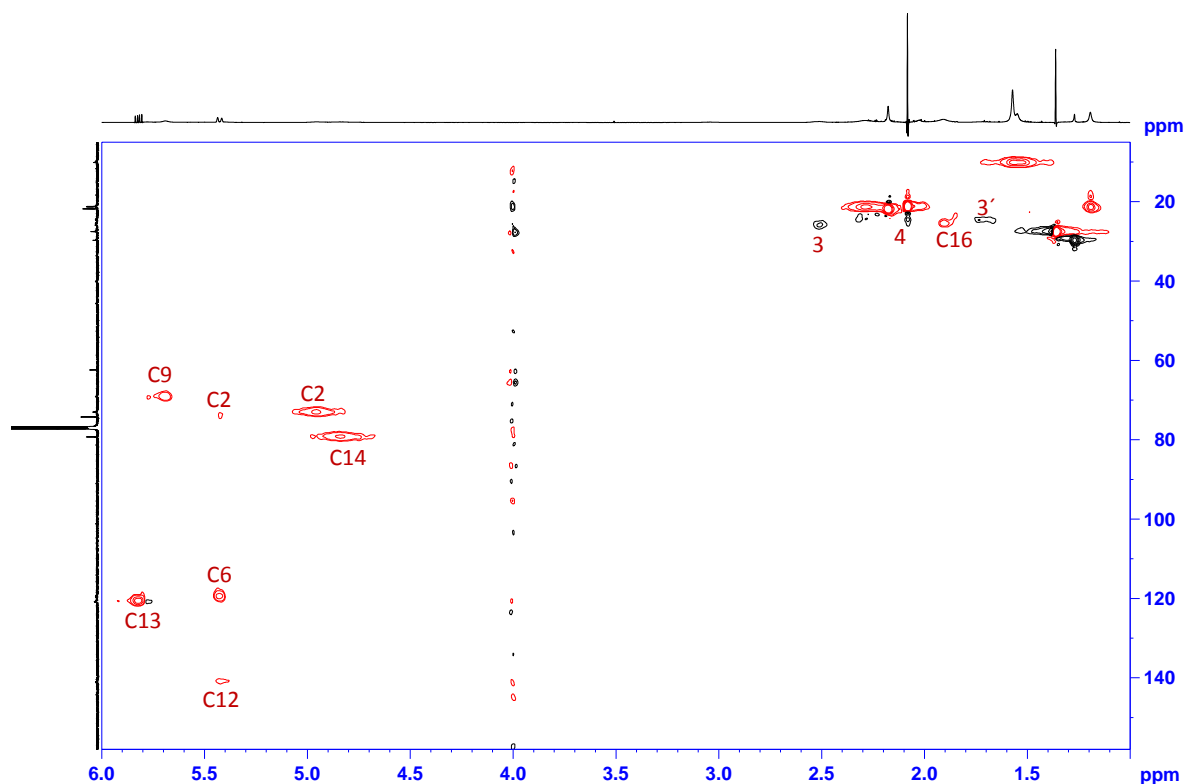


Figura 32. Espectro bidimensional HSQC editado (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **2**

El último paso para deducir la estructura plana de **2** supuso la conexión entre los sistemas de espín. Esto se consiguió a partir de las correlaciones entre carbonos y protones a dos o tres enlaces de distancia observadas en el experimento HMBC (Figura 34). En la Figura 33 se describen las correlaciones más importantes observadas en este experimento.

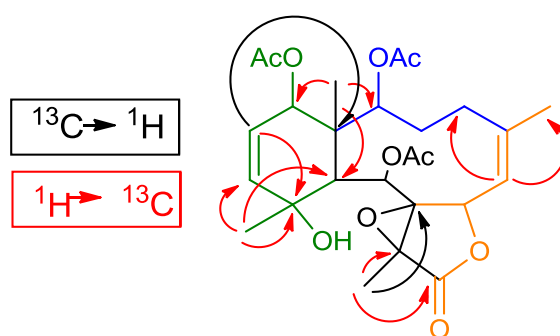


Figura 33. Correlaciones mas importantes observadas en el experimento HMBC de **2**.

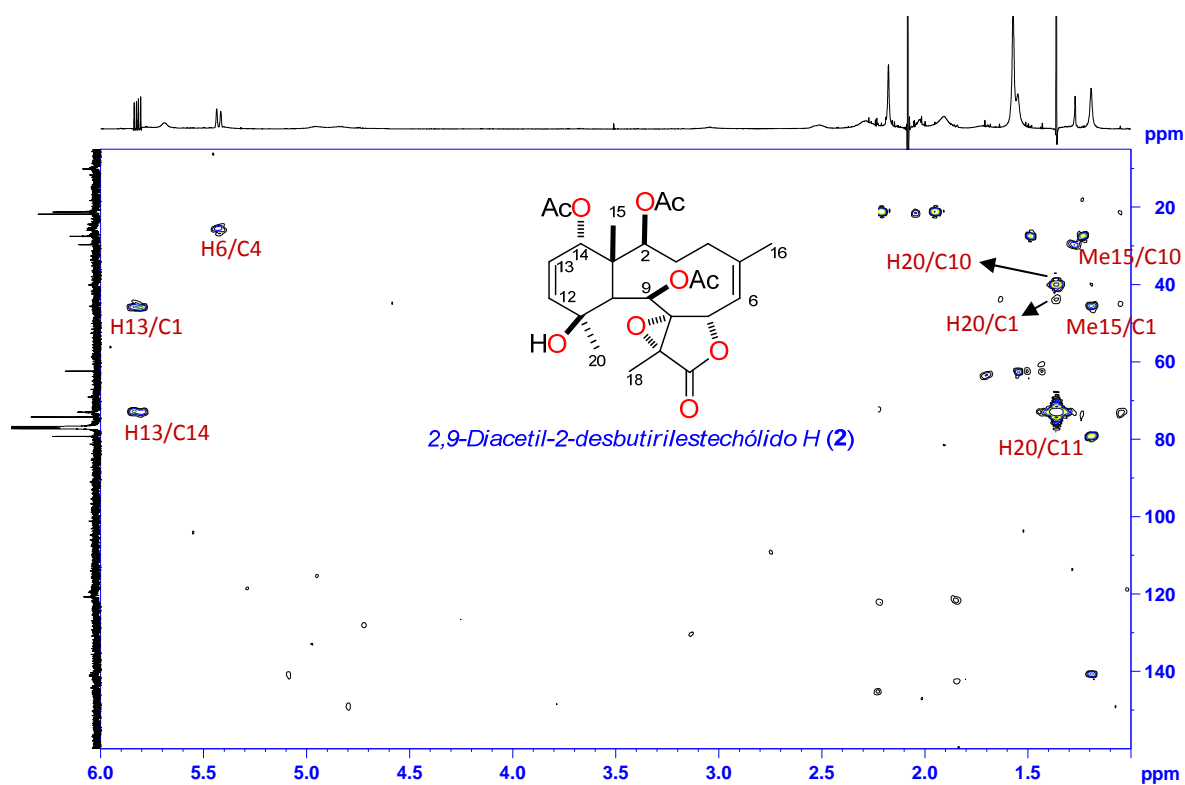


Figura 34. Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) con las correlaciones protón-carbono claves observadas en el compuesto 2.

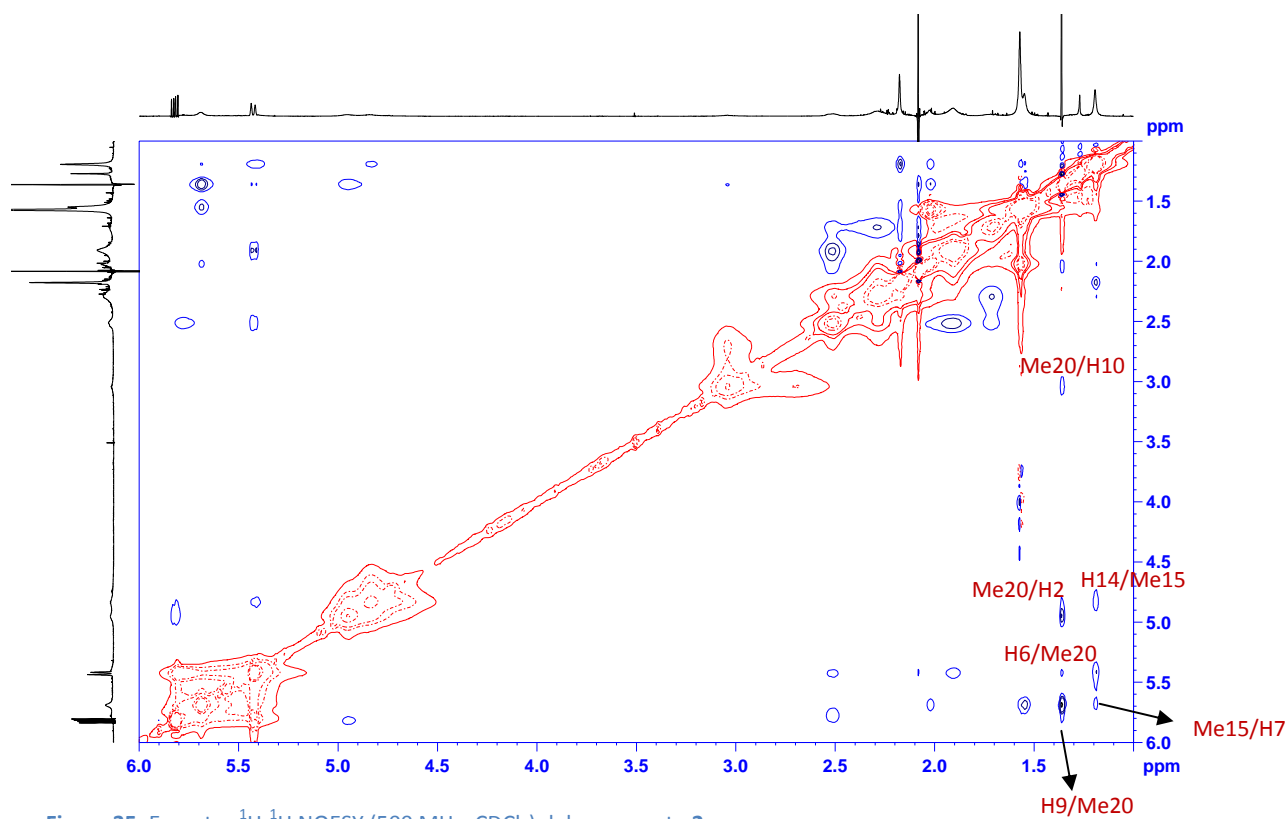


Figura 35. Espectro ^1H - ^1H NOESY (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 2.

La estereoquímica relativa de este compuesto se dedujo por comparación de los datos espectroscópicos de **2** con los descritos en la bibliografía para estechólido H,³¹¹ ya que los desplazamientos químicos de los dos compuestos fueron muy similares. Ambos poseían un esqueleto semejante pero con diferentes sustituciones en C2 y C9, lo cual se dedujo por la ausencia de señales de un grupo butirato presente en **11**, y por otro lado el desplazamiento a mayor frecuencia de H9 a δ_H 5.66 en relación al de H9 del estechólido H. Además el carbono C10 a δ_C 40.3 resonó a menor frecuencia ($\Delta \delta$ 0.6 ppm) respecto a ese mismo carbono en estechólido H. Estas diferencias son características de los desplazamientos esperados tanto en protón como en carbono para las posiciones α y β de una esterificación con un grupo acetato. La configuración α del grupo metilo C20 y del epóxido en C8 y C17 en el anillo de la lactona en **2** se confirmó por el desplazamiento químico de los carbonos C20 a δ_C 27.6 del grupo metilo y por los de los carbonos C8, C17 y C18 (δ_C 68.9, 62.4 y 10.1 respectivamente) siendo idénticos con compuestos relacionados con esqueleto 8,17 α -epoxibriaranos.

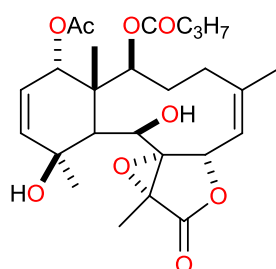


Figura 36: Estructura del estechólido H (**11**).

El espectro NOESY de **2** confirmó la estereoquímica relativa anteriormente propuesta para este derivado de estechólido H. Así las correlaciones entre el Me15 y H14 indican la posición relativa de los grupos metilo en C1 y acetato de C-14, mientras que las correlaciones NOESY entre H10 y Me20, H6 y Me20 y entre H6 y H10 son características en los esqueletos de briarano.

Este derivado de estechólido H, al que hemos denominado 2,9-diacetil-2-debutirilestecholido H (**2**), es la primera vez que se describe en la bibliografía constituyendo por tanto un nuevo producto natural.

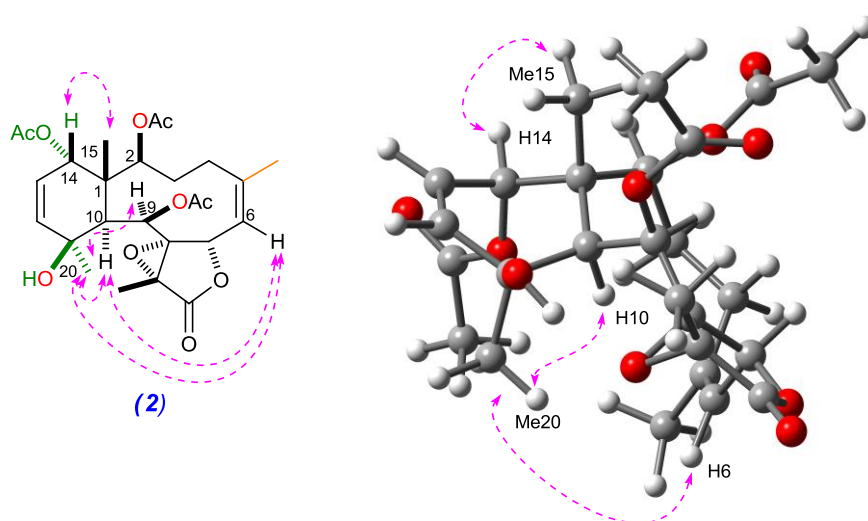
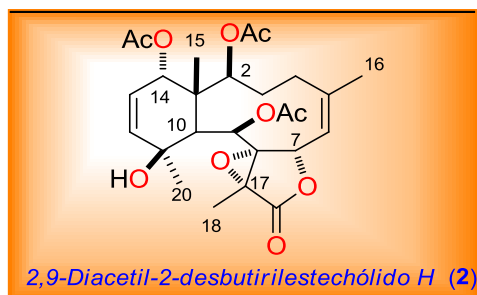


Figura 37. Correlaciones NOESY más importantes observadas en **2**.

El compuesto **2** no presentó actividad citotóxica alguna frente a células tumorales **P-388**, **A-549**, **HT-29** y **MEL-28** a concentraciones menores de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 6. Datos de RMN- ^1H y ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) del 2,9-diacetil-2-desbutirilxiestechólido (**2**) en CDCl_3 .



Posición	δ_{H} (ppm), mult. J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	45.7
2	4.95 sa	72.9
3/3'	2.55 m/ 1.71 m	25.5
4/4'	1.89 m/2.55 m	24.7
5	-	145.5
6	5.42 da	119.5
7	5.41 sa	74.3
8	-	68.9
9	5.66 sa	68.9
10	3.03 sa	40.3
11	-	73.1
12	5.40 da	141.2
13	5.82 dd 10.2, 5.6	120.7
14	4.86 sa	79.3
15	1.24 s	21.2
16	1.85 sa	25.6
17	-	62.4
18	1.57 s	10.1
19	-	171.5
20	1.42 s	27.6
-O $\underline{\text{C}}$ OCH $_3$	-	169.9
-O $\underline{\text{C}}$ OCH $_3$	2.25 s/2.07 s	21.2/21.8

1.2.1.2.4.3 Acetato de 2 β -acetoxi-2-(desbutiriloxi)estechólido E (3)

El compuesto **3** se aisló de la fracción FDC4H2' mediante HPLC usando una columna de fase invertida μ -Bondapack C₁₈ con MeOH:H₂O (2:3) como fase móvil, eluyéndose con un t_R de 37.16 min. Mostró una rotación óptica específica $[\alpha_D]$ -32.0° (CH₂Cl₂ c 0.1).

Su espectro de masas FAB positivo (Figura 38) mostró los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ a m/z 507 y $[M+Na]^+$ a m/z 529, que se corresponden con una fórmula molecular C₂₆H₃₄O₁₀.

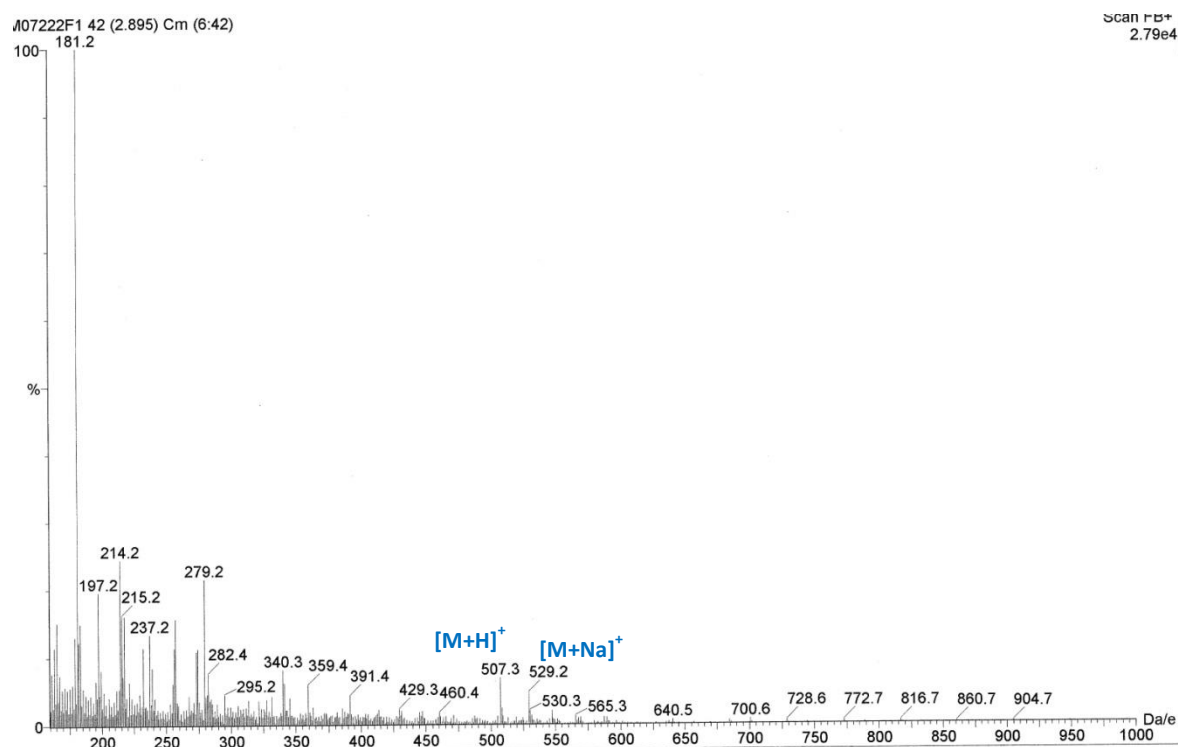


Figura 38. Espectro de masas FAB ion positivo del compuesto **3**.

El espectro de RMN ¹H a 200 MHz (Figura 39) muestra como señales más representativas la presencia de 6 singuletes, de los cuales tres a δ_H 2.01, 2.03 y 2.04 se asignaron a grupos metilo de acetato, otro a δ_H 2.06 s a un metilo vinílico y los otros dos δ_H 1.43 s y 1.68 s a dos grupos metilos unidos a carbonos de epóxido. Adicionalmente, se observan señales de 3 protones de carbonos metínicos oxigenados a δ_H 4.89 (H2), 5.74 (H9) y 4.71 (H14).

La comparación de estos datos espectroscópicos con los de otros diterpenos tipo briarano publicados en la bibliografía indicó que este compuesto es idéntico al derivado acetilado de 2 β -acetoxi-2-(desbutiriloxi)estechólido E aislado por Schmitz y colaboradores³¹² de una gorgonia del género *Briareum* recolectada en Formosa, que había sido obtenido por acetilación de ese compuesto en ese mismo trabajo. Por tanto, el compuesto **3** es la primera vez que se aísla como producto natural y se ha denominado como acetato de 2 β -acetoxi-2-(desbutiriloxi)estechólido E (**3**).

³¹² Pordesimo E. O., Schmitz L. S., Ciereszko L. S., Hossain M. B., Van der Helm D. J. *Org. Chem.* **1991**, 56, 2344.

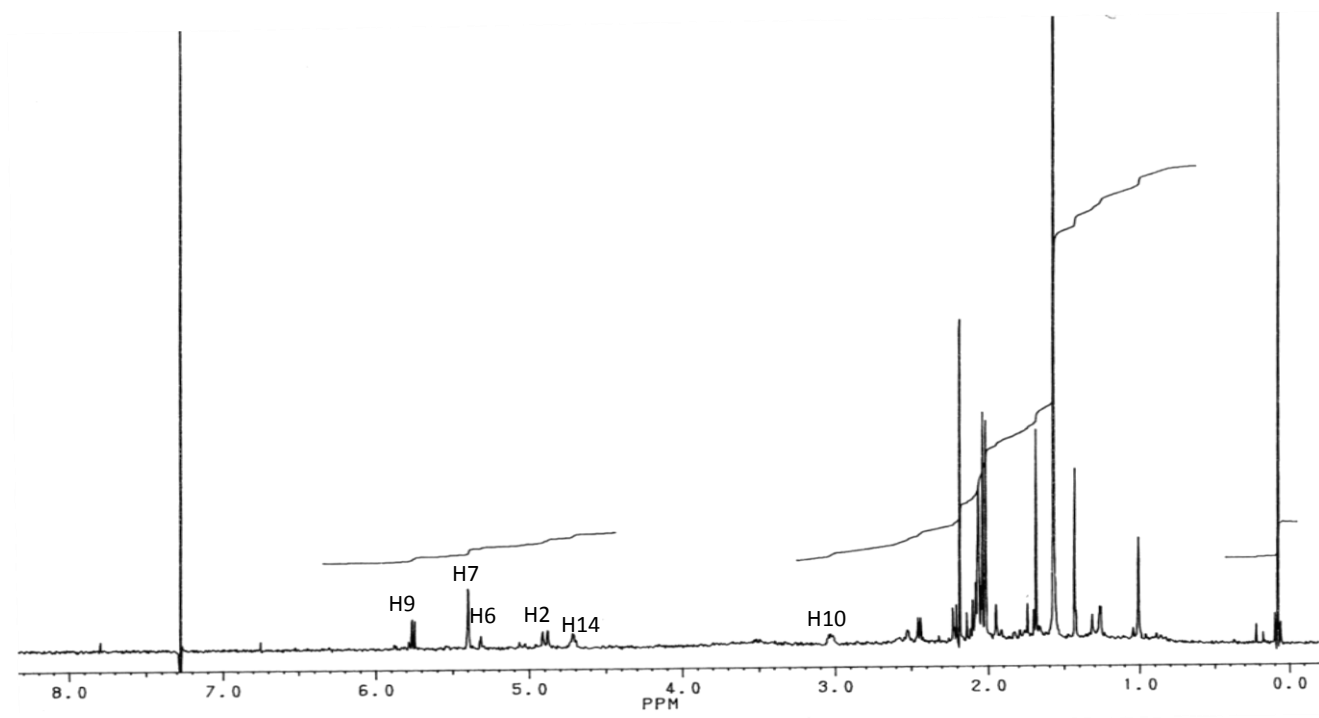
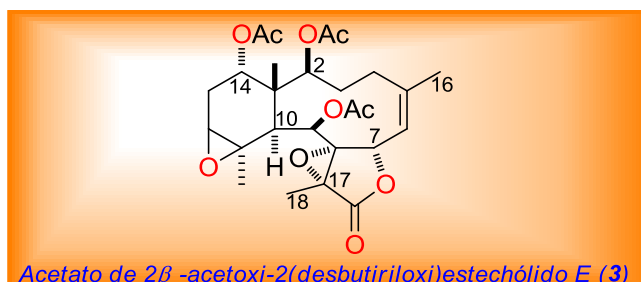


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) del compuesto **3**.

Tabla 7. Datos de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) del compuesto *acetato de 2 β -acetoxi-2-(desbutiriloxi)estechólido E* (**3**).

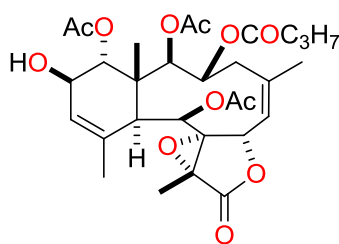


Posición	δ_{H} (ppm), mult. J (Hz)
2	4.89 d 6.4
3	2.59 m/ 1.70m
4	2.54 m
6	5.3 sa
7	5.38 s
9	5.74 d 3.5
10	2.45 d 3.5
12	3.03 sa
13	2.04 m/2.14 m
14	4.71 sa
15	1.0 s
16	2.06 s
18	1.68 s
20	1.43 s
-OAc	2.01 s
-OAc	2.03 s
-OAc	2.04 s

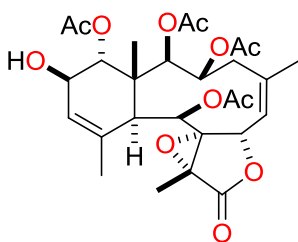
Aunque en nuestros ensayos, el compuesto **3** no presentó actividad citotóxica frente a células tumorales P-388, A-549, HT-29 y MEL-28 a concentraciones menores de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la publicación donde lo obtienen por acetilación de **3** se menciona que posee citotoxicidad contra células P-388 (leucemia de ratón) con un valor de EC_{50} de 1.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$.^{313,314}

I.2.1.2.4.4 Otros compuestos aislados

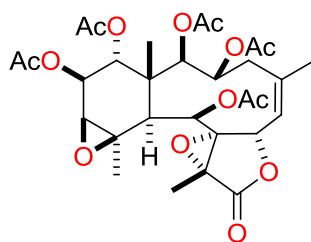
Además de los compuestos **1-3** se aislaron los compuestos estechólido I (**4**), estechólido J (**5**), estechólido K (**6**), estechólido L (**7**), estechólido M (**8**), acetato de estechólido A (**9**) y acetato de estechólido C (**10**) que fueron identificados por comparación de los datos espectroscópicos que aparecen para estos compuestos en la bibliografía.³¹⁴



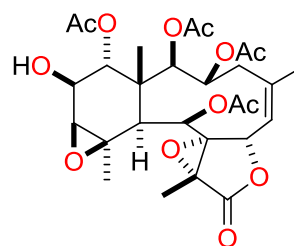
Estechólido I (4)



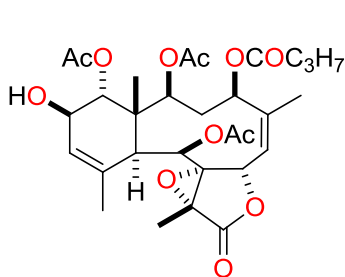
Estechólido J (5)



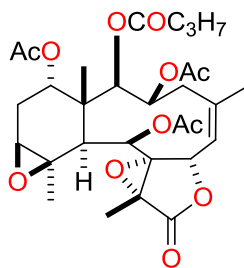
Estechólido K (6)



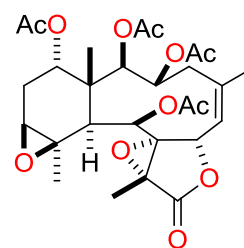
Estechólido L (7)



Estechólido M (8)



Acetato de estechólido A (9)



Acetato de estechólido C (10)

³¹³ Sheu J., Sung P., Huang L., Lee S., Wu T., Chang B., Duh C., Fang L., Soong K., Lee T. J. *Nat. Prod.* **1996**, 59, 935.

³¹⁴ Schmitz F. J., Shulz M. M., Siripitayanon J., Hossain M. B., van der Helm D. J. *Nat. Prod.* **1993**, 56, 1339.

I.2.1.2.4.5 Actividad biológica

La evaluación citotóxica de los compuestos de **4-7**, **9** y **10** mostró que estechólido L (**7**) posee una débil actividad citotóxica frente a las células tumorales P-388 (IC₅₀ de 10 µg/mL), A-549 (IC₅₀ de 2.5 µg/mL), HT-29 (IC₅₀ de 5 µg/mL) y MEL-28 (IC₅₀ de 5 µg/mL), mientras que los compuestos de **4-6**, **9** y **10** no mostraron actividad citotóxica frente a esas células tumorales a concentraciones menores de 10 µg/ml.



I.2.2.1 Introducción: derivados clorados de la esponja *Dysidea* sp.

Las esponjas del género *Dysidea* presentan una gran variedad taxonómica, conociéndose en la actualidad más de cincuenta especies.³¹⁵ Esta enorme diversidad filogenética se refleja también en el elevado número de metabolitos secundarios que han sido descritos hasta la fecha.³¹⁶ Se han estudiado químicamente 18 especies de *Dysidea*, publicándose más de cuatrocientos compuestos, siendo la mayoría de ellos de naturaleza terpénica.³¹⁷

Desde el punto de vista taxonómico, el género ha sido reclasificado en el 2002 con dos nombres diferentes, *Dysidea* o *Lamellodysidea*, dependiendo de su forma de crecimiento.³¹⁸

De la especie *Dysidea herbacea*, reclasificada como *Lamellodysidea herbacea*, se han publicado compuestos de naturaleza sesquiterpénica, derivados peptídicos clorados y éteres difenilpolibromados (PBDE), cuyo origen biogenético ha generado una gran controversia. A partir del aislamiento del primer PBDE en esponjas y la evidencia de su posible origen bacteriano en *Dysidea*, han habido numerosos estudios simbióticos que se han centrado en determinar cuál es el verdadero origen de cada uno de los compuestos aislados de estas esponjas.³¹⁹

I.2.2.1.1 Simbiosis

No se conoce una definición exacta de simbiosis que pueda ser aplicada universalmente al amplio espectro de asociaciones que se han observado en la naturaleza. Uno de los mejores ejemplos para definir la constante simbiosis entre esponjas y algunas bacterias es aquella asociación en la que el microorganismo se encuentra cohabitando entre los tejidos de la esponja y sus células.³²⁰ Esta definición requiere que en una población particular de esponjas, cada una contenga la misma distribución de microorganismos. Esta simbiosis beneficia claramente a los dos organismos, ya que en cierto modo mejora la salud de la esponja y proporciona un medio favorable en el que el microorganismo pueda crecer en unas condiciones de desarrollo que no tendría en otro medio. Estos simbioses ayudan además a mantener su fuente de alimento y evita que crezcan otros microorganismos perjudiciales para la esponja. Desde el punto de vista de la química de productos naturales, este hecho plantea la posibilidad de que en muchos casos sean los simbioses los verdaderos productores de las sustancias químicas que protegen a la esponja de potenciales depredadores.

³¹⁵ a) Van Soest R.W.M., Boury-Esnault N., Hooper J.N.A., Rützler K., de Voogd N.J., Alvarez de Glasby B., Hajdu E., Pisera A.B., Manconi R., Schoenberg C., Janussen D., Tabachnick K.R., Klautau M., Picton B., Kelly M., Vacelet J., Dohrmann M., Díaz M. C. World Porifera database. **2013**. Fecha de acceso a <http://www.marinespecies.org/porifera>, 07-05-2013. b) Erpenbeck D, Hooper J. N. A., Bonnard I., Sutcliffe P., Chandra M., Perio P., Wolff C., Banaigs B., Wörheide G., Debitus C., Petek S. *Mar. Biol.* **2012**, 159, 1119.

³¹⁶ Blunt J. W., Copp B., Keyzers R. A., Murray H., Munro G., Prinsep M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 144.

³¹⁷ Blunt J. W., Munro M. H. G. *MarinLit* Database 17-02-2012.

³¹⁸ Cook S.D.C., Bergquist P. R. **2002** Family Dysideidae gray, 1867. In: Hooper JNA, Van Soest RWM Eds. Kluwer/Plenum, Dordrecht, New York, pp 1061.

³¹⁹ a) Dunlop R. W., Kazlauskas R., March G., Murphy P. T., Wells R. J. *Aust J Chem* **1982** 35, 95. b) Elyakov G. B., Kuznetsova T., Mikhailov V. V., Maltsev I., Voinov V. G., Fedoreyev, S. A. *Experientia* **1991** 47, 632.

³²⁰ a) Bergquist P. R. Sponges. University of California Press, Berkeley, CA, **1978**, 197. b) Wilkinson, C. R. in *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored*, W. Reisser Ed. Biopress Ltd., Bristol, UK, 111. c) Sauleau P., Retailleau P., Vacelet J., Bourguet-Kondrackia M. L. *Tetrahedron* **2005** 61, 955.

Uno de estos ejemplos lo constituye *Dysidea herbacea* (*Lamellodysidea herbacea*), esponja muy común de aguas poco profundas, de la que se conocen varios quimiotipos (esponjas con diferentes tipos de metabolitos secundarios). De uno de ellos se aislaron metabolitos derivados de aminoácidos policlorados y sesquiterpenos, mientras que de otro quimiotipo se aislaron solo polibrominados (PBDEs). Ambos quimiotipos soportan grandes poblaciones de un simbionte filamentoso que es una cianobacteria denominada *Oscillatoria spongeliae*, cuya relación ha sido establecida de manera inequívoca en estudios biológicos.³²¹ Se piensa que algunos de los metabolitos policlorados aislados de *Dysidea herbacea*, y que son similares a los aislados de la cianobacteria libre, podrían ser sintetizados por la cianobacteria simbiote. Sin embargo, los sesquiterpenos que se aislaron de *Dysidea* se consideran los verdaderos metabolitos de la esponja. Los PBDEs y los sesquiterpenos herbadisidólido y espirodisina se han aislado de las células de la esponja, mientras que el dipéptido policlorado 13-dimetilisodidenina se ha aislado sólo de las células de la cianobacteria (Figura 40).³²²

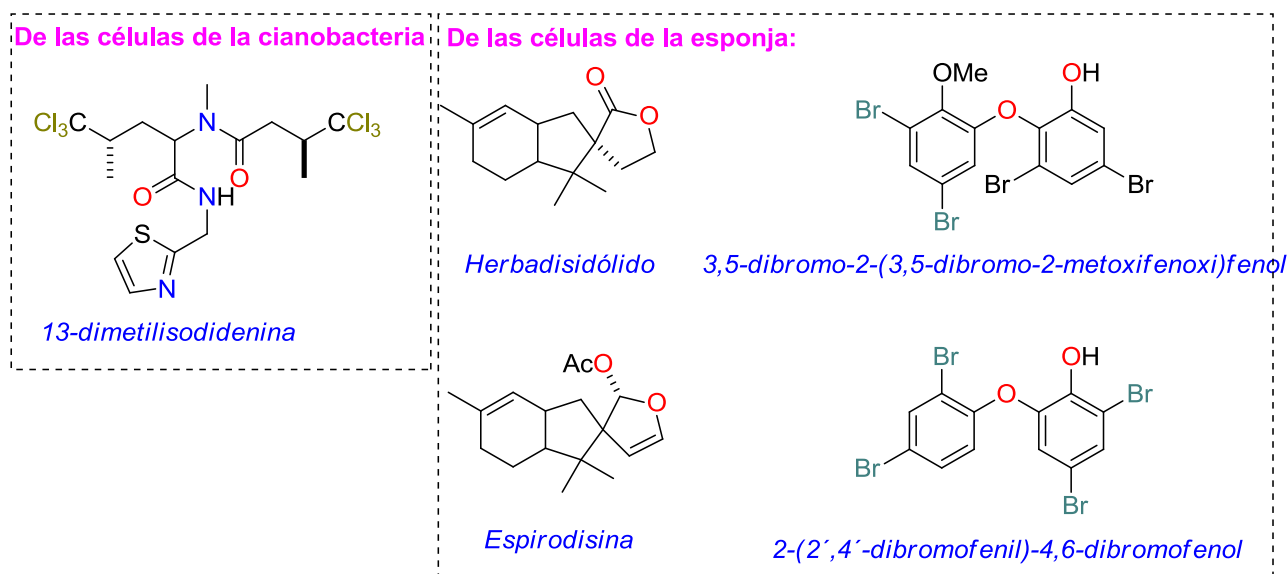


Figura 40. Metabolitos aislados de las células de esponja y de las células de cianobacteria.

Además, los PBDEs que se han aislado de especies de *Dysidea*, también han sido encontrados en un extracto de una bacteria cultivada del género *Vibrio* aislada de un ejemplar de *Dysidea*.³²³

De otro espécimen de *Dysidea herbacea* recolectada en una laguna cerca del Hotel Nikko en islas Palau, se aisló el 2-(2',4'-dibromophenyl)-4,6-dibromophenol como metabolito mayoritario.^{324,323b} De otras tres especies de *Dysidea* recolectadas en esa misma localización, dos de ellas contenían diferentes difeniléteres polibrominados mientras que la tercera sólo sesquiterpenos. Del nudibranquio *Chromodoris funereu*, común en las mismas localizaciones de esas esponjas, se aislaron mezclas complejas de difeniléteres polibrominados

³²¹ Berthold R. J., Borowitzka M. A., Mackay M.A. *Phycologia* **1982**, 21, 327.

³²² Unson M.D., Faulkner D. J. *Experientia* **1993**, 49, 349.

³²³ a) Elyakov G.B., Kuznetsova T., Mikhailov V. V., Maltsev I. I., Voinov V.G., Fedoreyev S.A. *Experientia* **1991**, 47, 632. b) Voinov V.G., Elkin Y. N., Kuznetsova T., Maltsev I.I., Mikhailov V.V., Sasunkevich A. A. *J. Chromat.* **1991**, 586, 360.

³²⁴ Elyakov G.B., Kuznetsova T., Mikhailov V.V., Maltsev I.I., Voinov V.G., Fedoreyev S.A. *Experientia* **1991**, 47, 632.

y sesquiterpenos que también habían sido aislados de otras especies de esponjas que fueron identificadas dentro del género *Dysidea*.³²¹

Otros metabolitos aislados de *Dysidea herbacea* (*Lamellodysidea herbacea*), en este caso recolectada en el Mar Rojo, fueron las dysidamidas cuyas estructuras se muestran en la Figura 41.^{325,326,327}

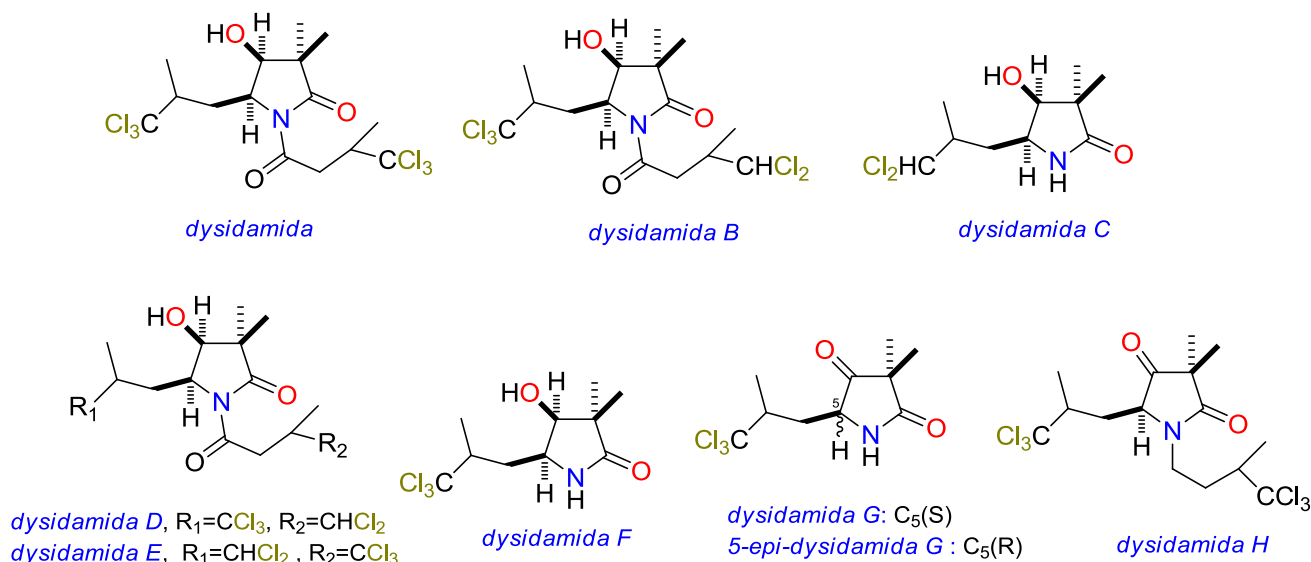


Figura 41. Estructuras de los compuestos aislados de una *Dysidea herbacea* (*Lamellodysidea herbacea*) recolectada en el Mar Rojo.

De otras esponjas del género *Dysidea* recolectados en Indonesia, se aislaron los derivados peptídicos sintokamidas A-E y varias dicetopiperazinas (Figura 42). Es de resaltar que sintokamida A, mostró una prometedora actividad como inhibidor del receptor andrógeno de las células cancerosas de próstata.³²⁸

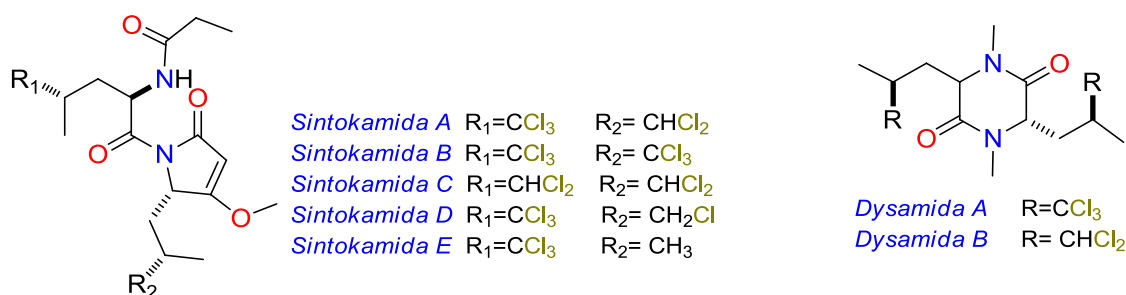


Figura 42. Estructuras de diversos compuestos aislados de *Dysidea* sp. procedentes de Indonesia.

³²⁵ Sauleau P., Retailleau P., Vacelet J., Bourguet-Kondracki M. L. *Tetrahedron* **2005**, 61, 955.

³²⁶ Gebreyesus T., Yosief T., Carmely S., Kashman Y. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 31, 3863.

³²⁷ Isaacs S., Berman R., Kashman Y., Gebreyesus T., Yosief T. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 83.

³²⁸ Sadar M. D., Williams D. E., Mawji N. R., Patrick B. O., Wikanta T., Chasanah E., Irianto H. E., Van Soest R., Andersen R. *J. Org. Lett.* **2008**, 10, 4947.

I.2.2.2 Estudio químico de la esponja *Dysidea* sp.

I.2.2.2.1 Identificación y clasificación

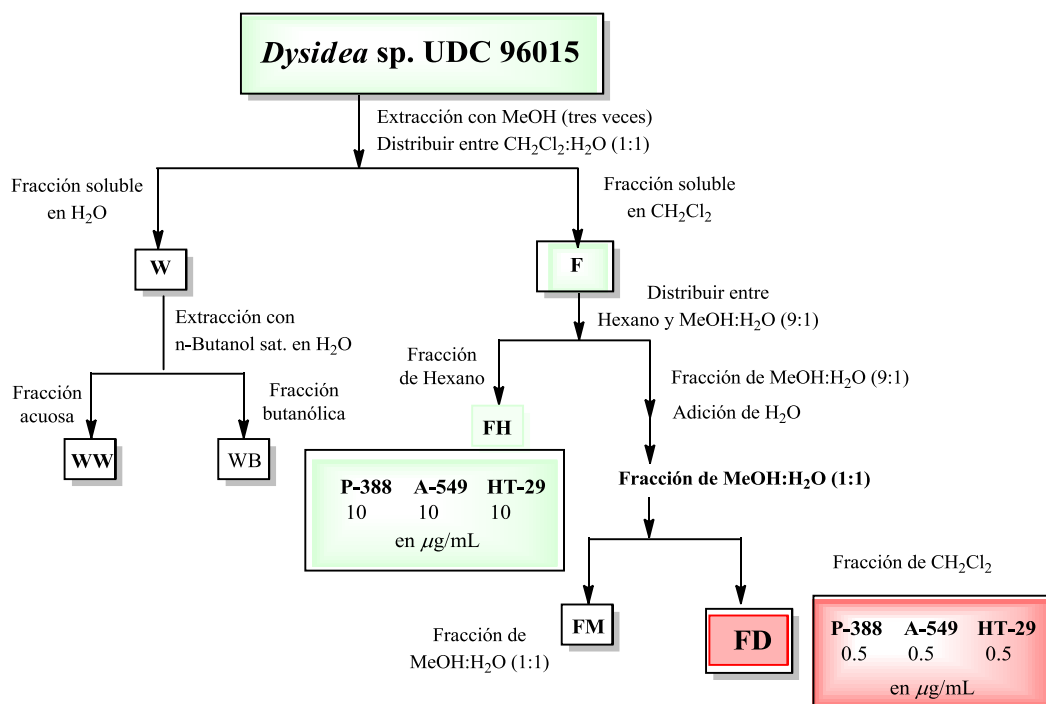
Los especímenes de *Dysidea* sp. (Figura 43) fueron recolectados en octubre de 1996 en la isla Mayo, en las cercanías de la isla de Sulawesi (Indonesia, coordenadas: 1°19'699 N, 126° 25'129 E) a una profundidad de 13 metros. Después de ser conservados en EtOH y llevados al laboratorio, se almacenaron a -20°C en el Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña bajo el código de referencia UDC96015. La identificación taxonómica de la esponja fue efectuada por la Dra. Cristina Díaz.



Figura 43. Fotografía subacuática de *Dysidea* sp.

I.2.2.2.2 Extracción y fraccionamiento

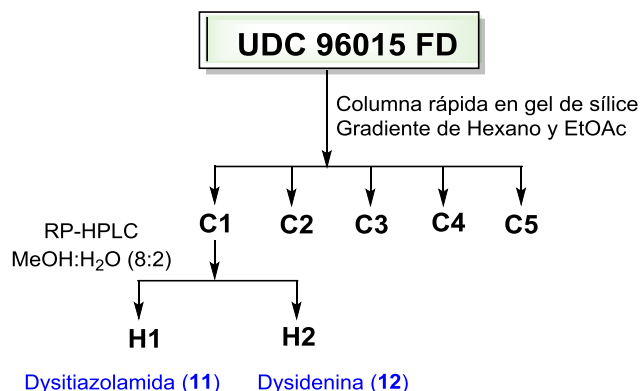
500 gramos de esponja fueron extraídos tres veces con metanol y el extracto metanólico resultante se fraccionó siguiendo el mismo procedimiento descrito para *Briareum* sp. (Esquema 6).



Esquema 6. Extracción y fraccionamiento de la esponja *Dysidea* sp.

I.2.2.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción de diclorometano **FD** (UDC96015FD) presentó una citotoxicidad contra células P-388, A-549 y HT-29 a 0.5 µg/mL por lo que se procedió a su estudio. Así, esta fracción se separó mediante cromatografía en columna rápida y HPLC para dar los compuestos puros **11** y **12**.

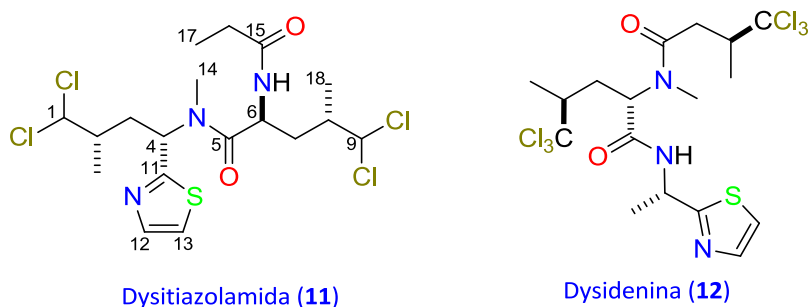


Esquema 7. Esquema de aislamiento y purificación de los compuestos aislados de *Dysidea* sp. a partir de la fracción de diclorometano **FD** (UDC96015FD).

I.2.2.2.4 Determinación estructural

La elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo realizando los siguientes experimentos:

Espectroscopia de RMN monodimensional: ¹H, ¹³C y DEPT-135; RMN bidimensional: ¹H-¹H COSY, HMBC, HMQC, ps-HMBC y ROESY. Espectrometría de masas: Ionización Química a Presión Atmosférica (APCIMS modo ion positivo) de baja y alta resolución. Los metabolitos aislados e identificados de la esponja se muestran a continuación:



I.2.2.2.4.1 Dysitiazolamida (11)

El compuesto **11** se aisló de la fracción **FDC1** (Esquema 7) procedente de la separación mediante una columna rápida de gel de sílice de la fracción de cloruro de metileno **FD** (Esquema 6). La purificación posterior de la fracción **FDC1** usando una columna de HPLC semipreparativa de fase invertida µ-bondapack C18 con

H₂O:MeOH (2:8) rindió **11** como un sólido amorfo con una rotación óptica específica de $[\alpha]_D -35^\circ$ (c 0.08, CH₂Cl₂).

El espectro de masas APCI de baja resolución (modo ión positivo) del compuesto **11** mostró una agrupación isotópica característica de la presencia de cuatro átomos de cloro, ya que el ión pseudomolecular $[M+H]^+$ estaba compuesto de cuatro señales a m/z 492, 494, 496 y 498 en una relación 7.8:10:4.8:1. La presencia de esos cuatro átomos de cloro se corroboró cuando se realizó el espectro APCI de alta resolución a uno de los picos isotópicos, lo que permitió además deducir la fórmula molecular de **11** como C₁₈H₂₇Cl₄N₃O₂S.

En los espectros de RMN de ¹³C y DEPT-135 se observaron 18 señales perfectamente resueltas que pudieron ser asignadas a cuatro metilos, tres metilenos, ocho metinos y tres carbonos cuaternarios.

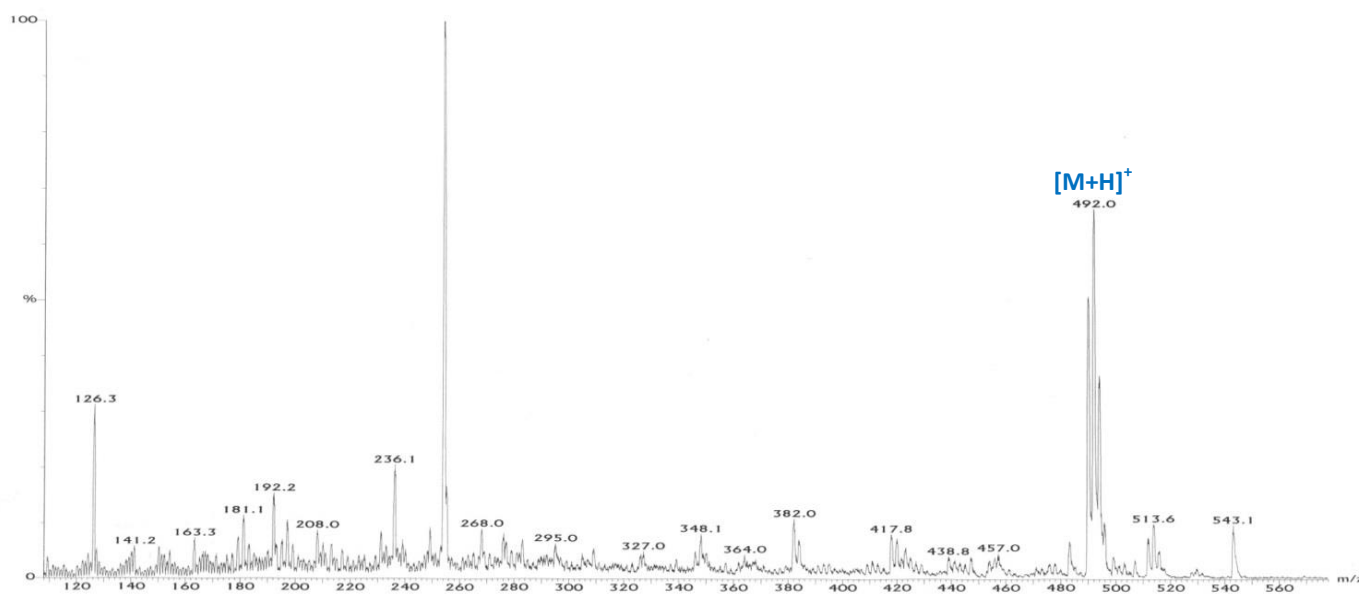


Figura 44. Espectro de masas (+)-APCI del compuesto **11**.

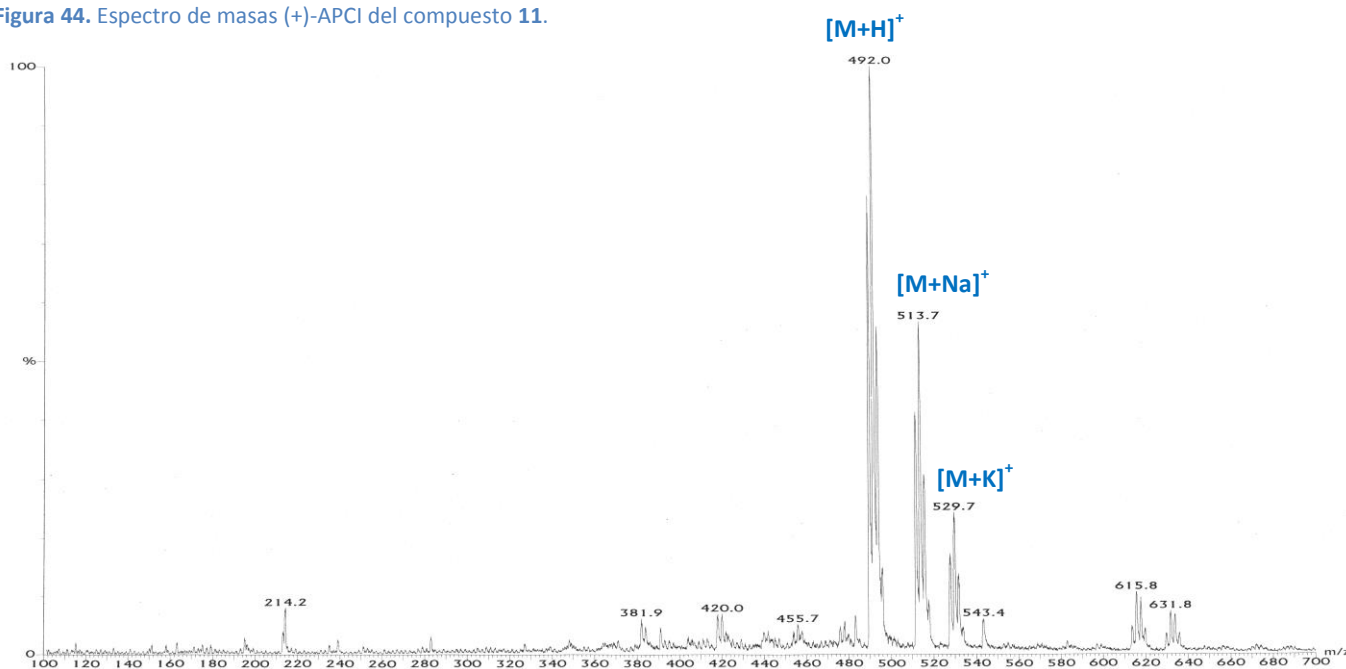


Figura 45. Espectro de masas (+)-APCI del compuesto **11** al adicionar NaCl y KBr.

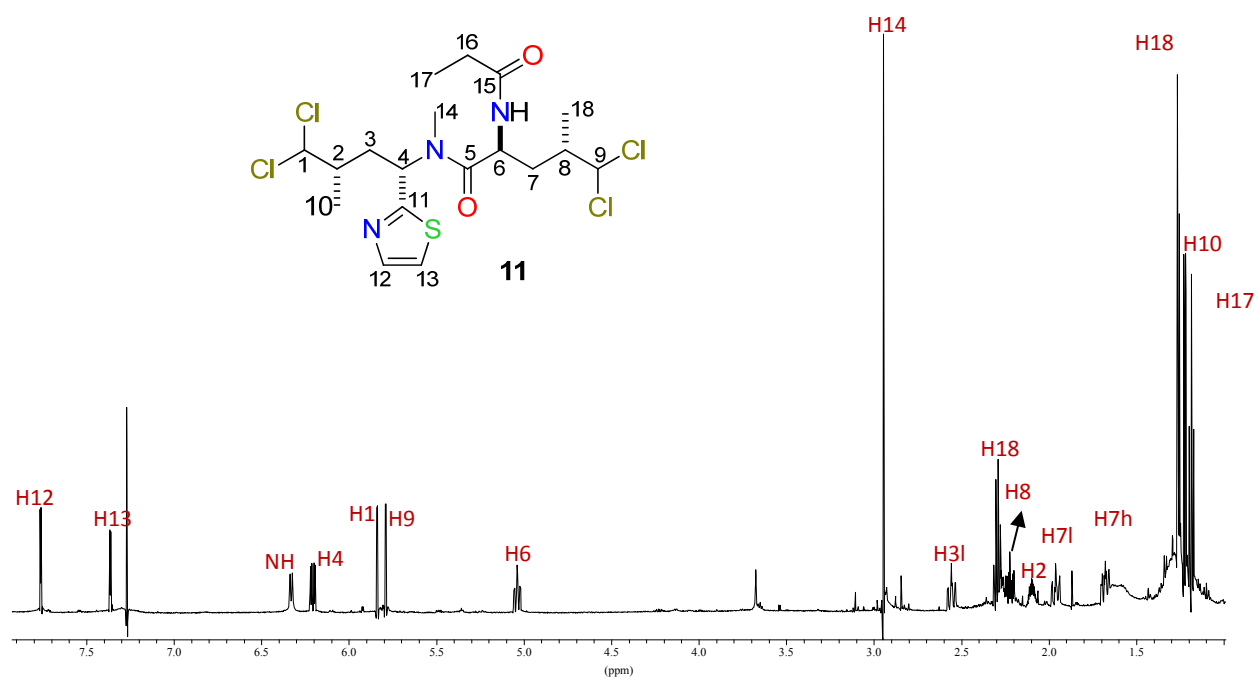


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **11**.

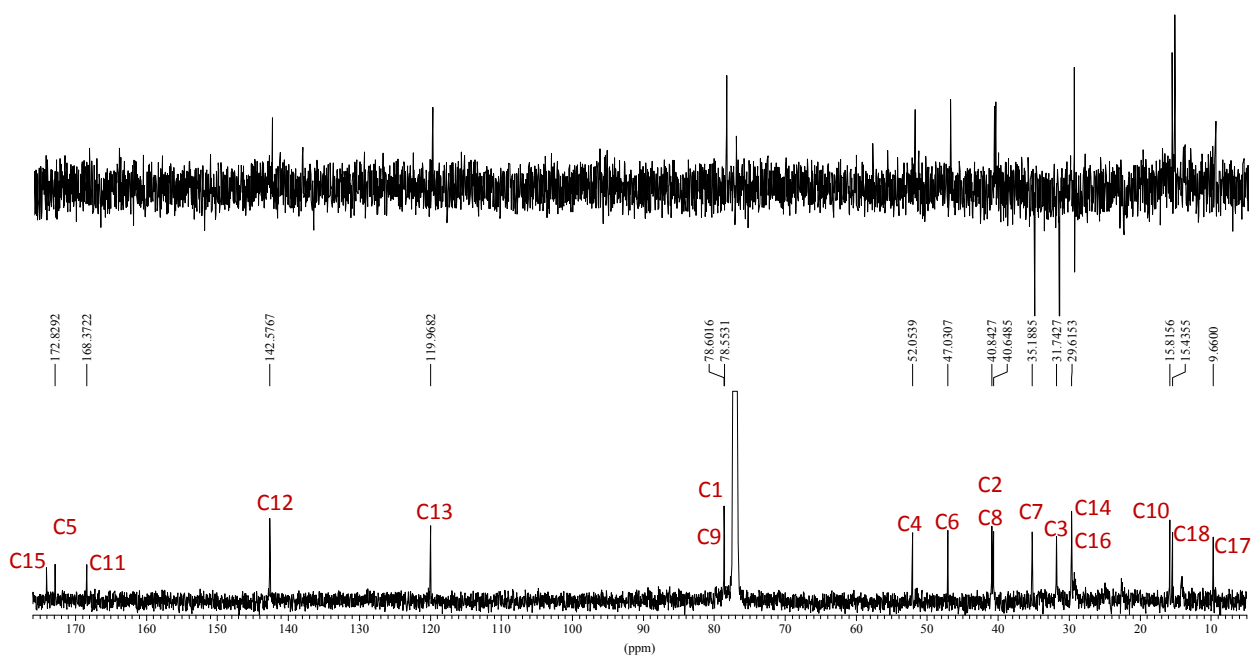


Figura 47. Espectros de RMN de ^{13}C y DEPT-135 (125 MHz, CDCl_3) del compuesto **11**.

A partir de los experimentos ^1H - ^1H COSY y HMQC de **11** se pudieron deducir dos sistemas de espín que eran muy semejantes y que fueron fácilmente identificados como derivados del aminoácido leucina. Empleando los anteriores experimentos se pudieron correlacionar los pares de núcleos H1/C1 (5.84 d/78.55, d), H2/C2 (2.10 dddd/40.84 d), $\text{H3,3'}/\text{C3}$ (H3l : 2.55 ddd, H3h : 2.22 ddd/31.18 t), H4/C4 (6.21 dd/52.05 d) del espín A y los H8/C8 (2.27 dddd/40.64 d), $\text{H7,7'}/\text{C7}$ (H7l : 1.96 ddd; H7h : 1.67 ddd/35.19 t), H6/C6 (5.04 ddd/47.03), NH (6.33 d) del espín B. La presencia de dos grupos diclorometilo en estos dos sistemas de espín pudo deducirse a partir de los desplazamientos químicos de los protones H1 a 5.84 d y H9 a 5.79 d y de los carbonos de C1 a 78.55 (CH) y C9 a 78.60 (CH). Por otra parte, la presencia de un grupo metilo unido al espín A fue deducida por la correlación HMBC que se observó entre el carbono metínico a δ_{C} 52.05 C4 y los protones del metilo C14 a δ_{H} 2.94, lo cual nos permitió colocar dicho grupo metilo sobre el nitrógeno adyacente a C4 . Teniendo en cuenta estos datos se pudieron deducir los fragmentos A y B de la Figura 48.

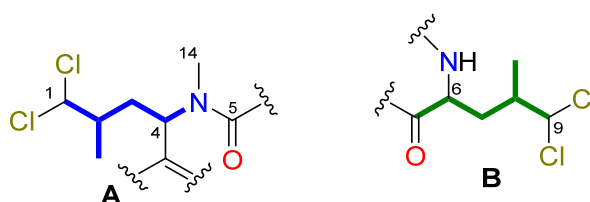


Figura 48. Fragmentos A y B del compuesto **11** deducidos a partir de los sistemas de espín obtenidos de los experimentos ^1H - ^1H COSY y HMQC

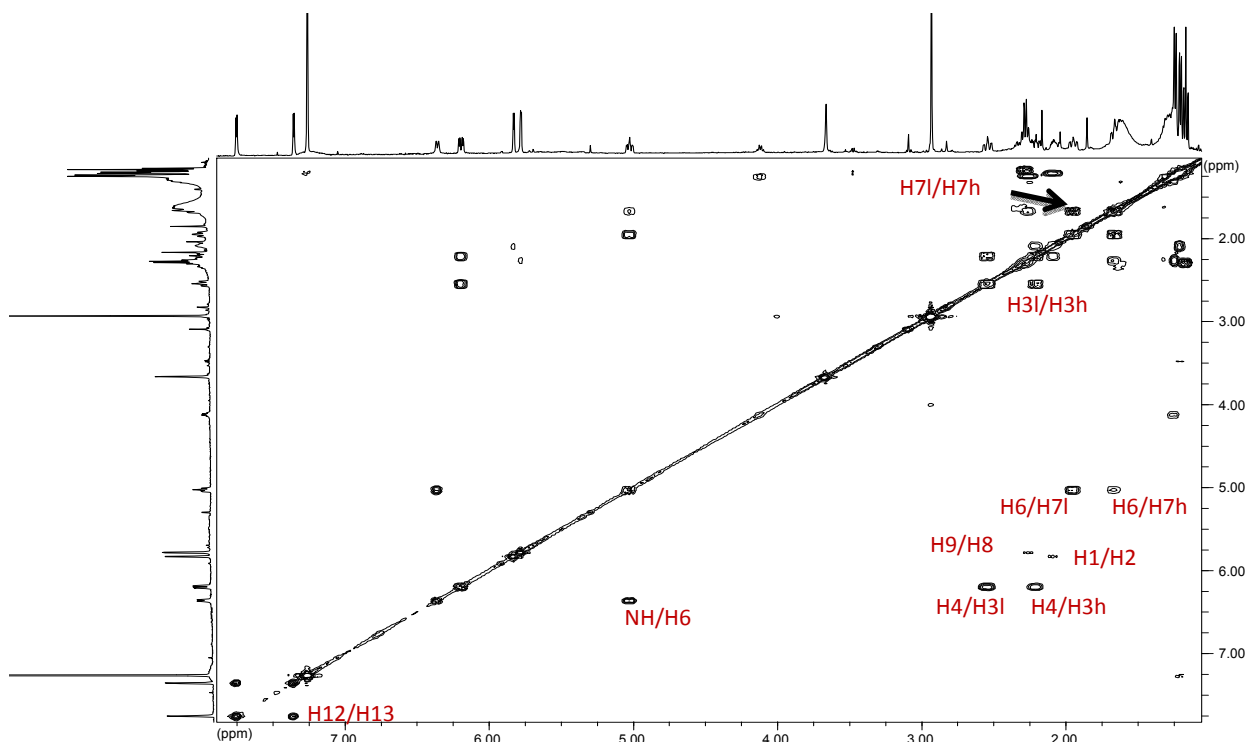


Figura 49. Espectro ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **11**.

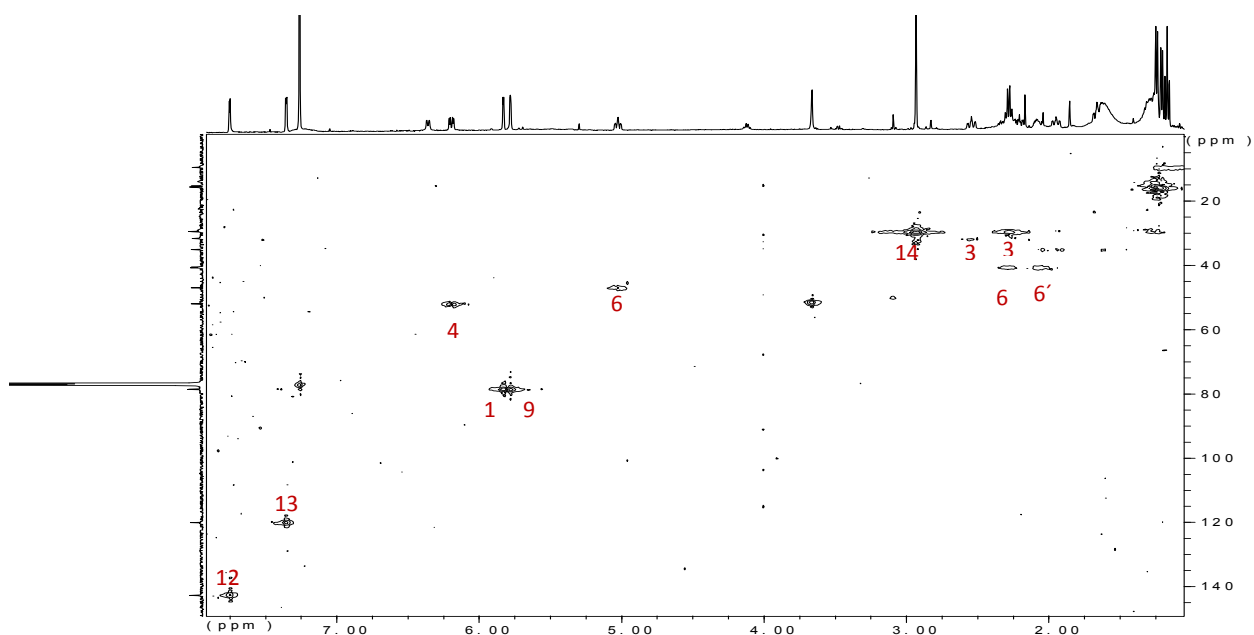


Figura 50. Espectro HMQC (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 11.

De los anteriores experimentos se pudo deducir además un tercer sistema de espín que se localizó dentro de un anillo de tiazol-2-ilo, fragmento **C** y un cuarto sistema de espín, fragmento **D**, formado por un grupo etilo (ver Figura 52). El fragmento **C** se conectó a C4 del fragmento **A** a partir de la correlación HMBC entre δ_{C} 168.37 (C11) y δ_{H} 6.21 (H4). Finalmente el fragmento **D** se unió al grupo NH del C6 del fragmento **B** por la correlación observada en HMBC entre el carbono C15 a δ_{C} 174.08 y el protón amida a δ_{H} 6.33.

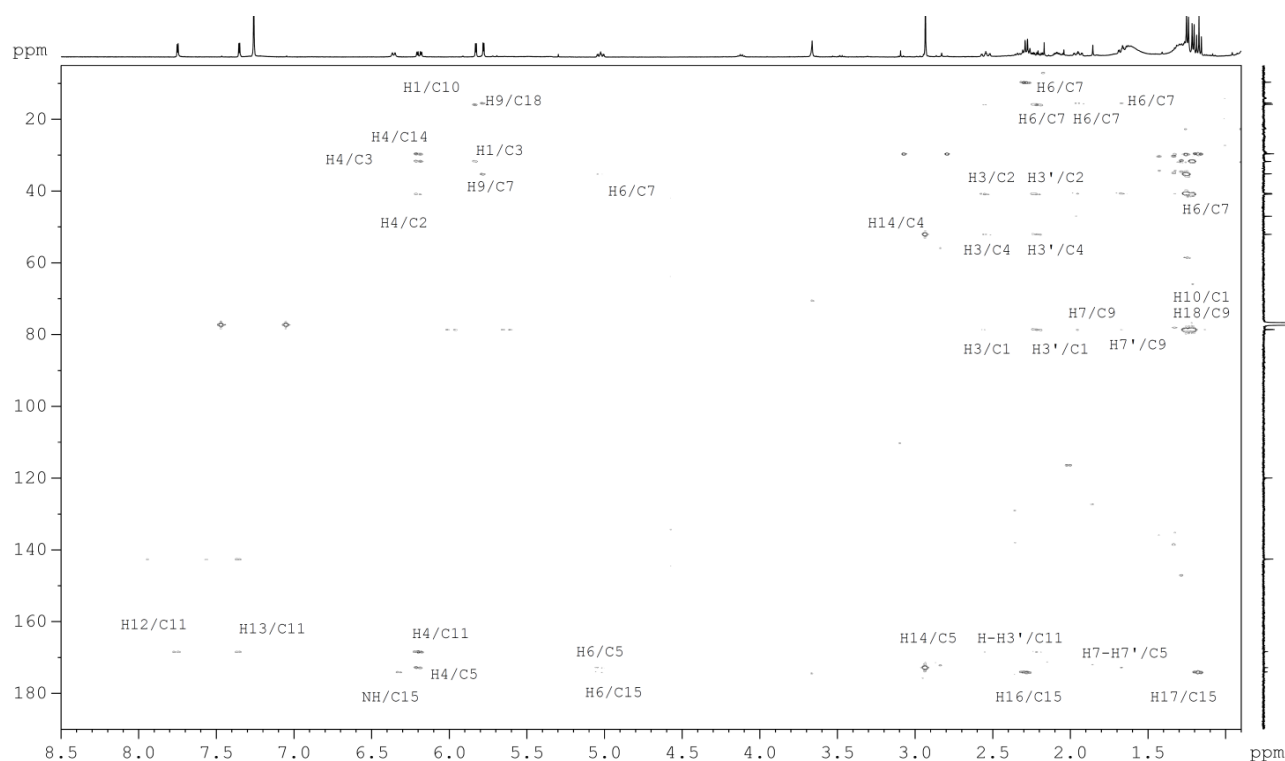


Figura 51. Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 11.

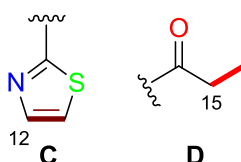


Figura 52. Fragmentos C y D deducidos de los experimentos ^1H - ^1H COSY y HMQC.

La conexión final entre los fragmentos A (segmento carbonado C1-C4) y B (segmento carbonado C6-C9) se estableció a partir de las correlaciones heteronucleares (Figura 53) observadas en el experimento HMBC entre C5 (δ_{C} 172.82) y los protones H6 (δ_{H} 5.04) y H14 (δ_{H} 2.94).

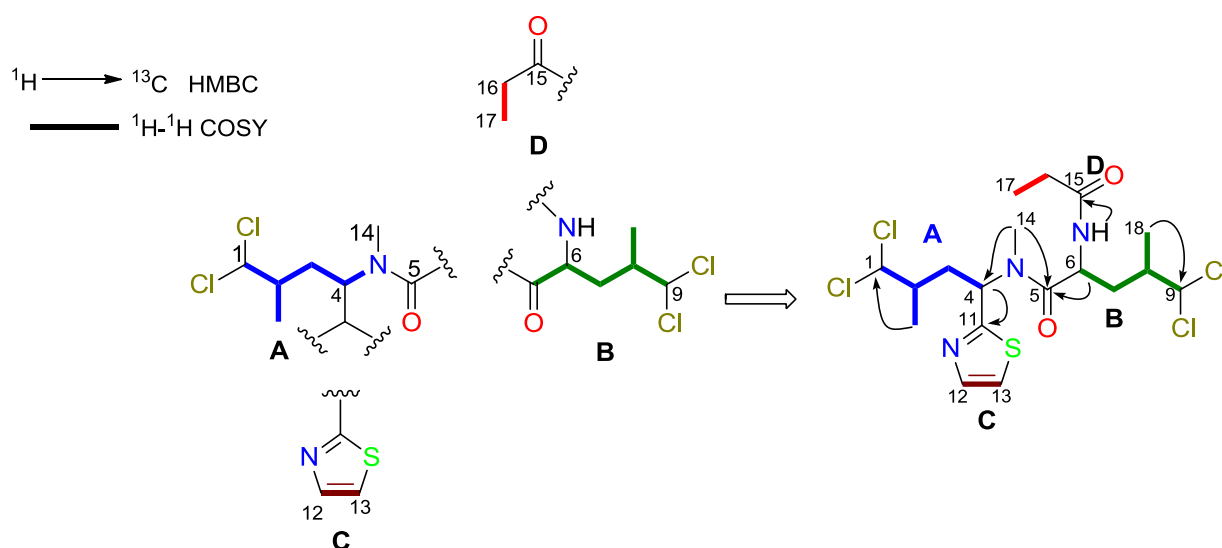


Figura 53. Sistemas de espín observados en dysitiazolamida y la conexión entre ellos mediante correlaciones HMBC.

Una vez deducida la estructura plana de **11**, el siguiente paso fue deducir la configuración tanto relativa como absoluta de los cuatro centros quirales presentes en su esqueleto. Los fragmentos acíclicos carbonados C1-C4 y C6-C9 son un buen ejemplo de aplicación de la metodología de Murata, también conocida como análisis configuracional basado en constantes de acoplamiento (JBA).³²⁹ Dada la presencia de átomos de nitrógeno y debido a la carencia de ejemplos similares publicados en la bibliografía, se decidió aplicar dicha metodología empleando una versión extendida del método Murata complementada con cálculos computacionales (QM), método conocido con las siglas QM-JBA.³³⁰

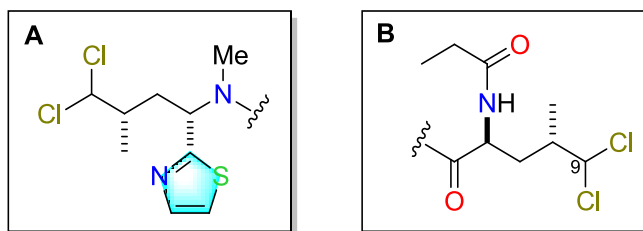
Dado que esta parte fue desarrollada en la Tesis Doctoral de la Dra. Ana Ardá basándose en el estudio de dicloroleucinas sintéticas como modelos análogos,³³¹ se describe de forma resumida las conclusiones obtenidas.

³²⁹ Matsumori N., Kaneno D., Murata M., Nakamura H., Tachibana K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866.

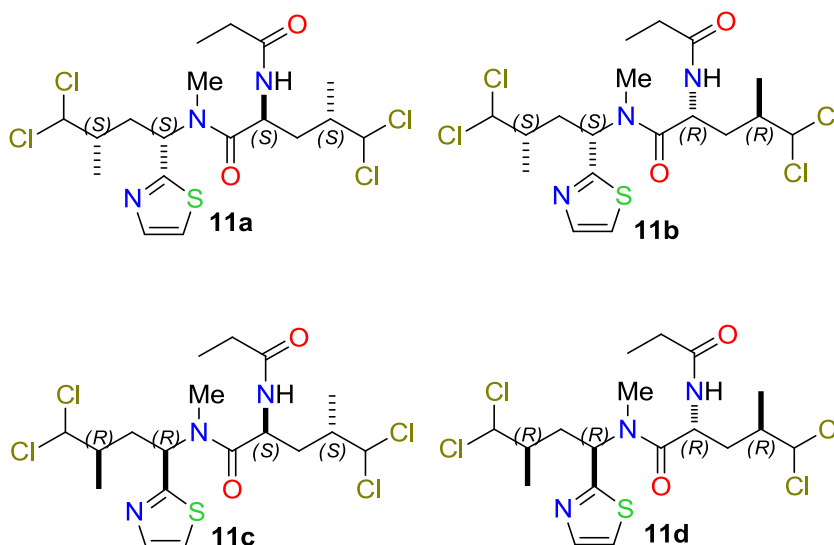
³³⁰ Bifulco G., Bassarello C., Riccio R., Gomez-Paloma L. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1025.

³³¹ a) Ardá A., Jiménez C., Rodríguez J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3241. b) Ana Ardá. Aplicación de las constantes de acoplamiento a la determinación de la configuración relativa de sistemas acíclicos 1,3-nitrogenados, estructura y síntesis de dysitiazolamida. Tesis Doctoral, **2006**.

En primer lugar, se estudiaron los seis conformeros alternados posibles para cada enlace mediante cálculos computacionales utilizándose métodos DFT con los funcionales B3LYP y mPW1PW91, usando conjuntos base 6-31G(d), 6-311G(d) para optimización y 6-31 G(d,p) y 6-311G(d,p) para los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento teóricas. A continuación, las constantes teóricas obtenidas se compararon con las experimentales observadas en los experimentos bidimensionales ps-HMBC y ROESY.^{331b} Todos estos cálculos permitieron proponer las siguientes configuraciones relativas para los fragmentos **A** y **B**:



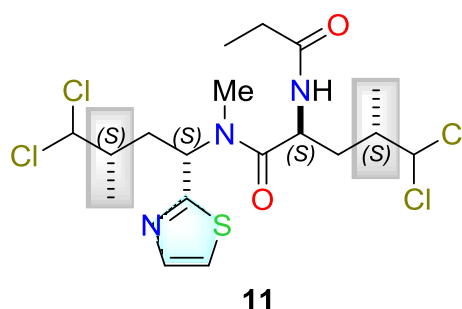
La combinación de las configuraciones relativas propuestas para estos dos fragmentos trae consigo las cuatro posibles estructuras siguientes, denominadas **11a-d**:



Para deducir la configuración absoluta de dysitiazolamida se recurrió a argumentos biogenéticos. Tal como se ha comentado en la introducción de este capítulo, de esponjas del género *Dysidea* se han aislado derivados peptídicos policlorados de la posible asociación simbiótica esponja-cianobacteria. Todos ellos tienen en común la presencia de grupos CHCl_2 ó CCl_3 en fragmentos del aminoácido leucina que posee siempre una configuración L (*S*-leucina). Se ha demostrado que la adición de los átomos de cloro ocurre siempre en el metilo pro-*R*, lo que genera una configuración *S* en este centro quiral.^{328, 332, 333} De esta manera, la posible

³³² a) Sitachitta N., Rossi J., Roberts M. A., Gerwick W. H., Fletcher M. D., Willis C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7131. b) Sauleau, P., Retailleau P., Vacelet J., Bourguet-Kondracki M.-L. *Tetrahedron* **2005**, 61, 955.

estereoquímica absoluta de este compuesto sería aquella que presente una configuración *S* en C2 y C8. Esta configuración en esos dos centros nos llevó a proponer a la estructura **11a** (configuración 2*S*,4*S*,5*S*,7*S*) como la única que cumplía el argumento biogenético.



Con el fin de confirmar esta propuesta, el producto natural tetrachlorado fue sintetizado por nuestro grupo de investigación a partir del ácido *L*-glutámico, utilizando una estrategia convergente, corroborándose la configuración absoluta propuesta con la hipótesis biogenética (Figura 54).

Debido a que el compuesto posee varios grupos amida y un grupo tiazol conjuntamente con su origen taxonómico, el compuesto **11** se denominó dysitiazolamida.

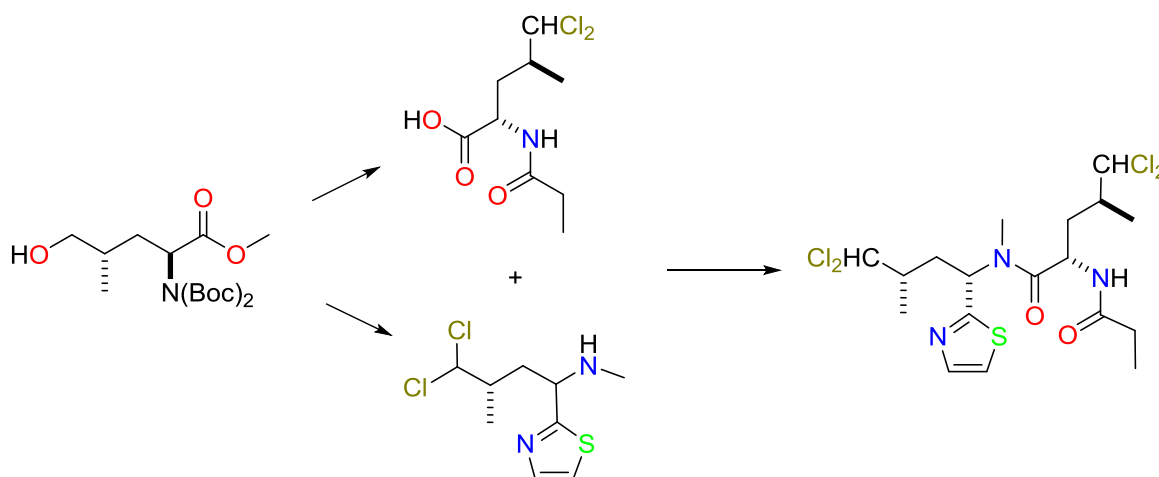
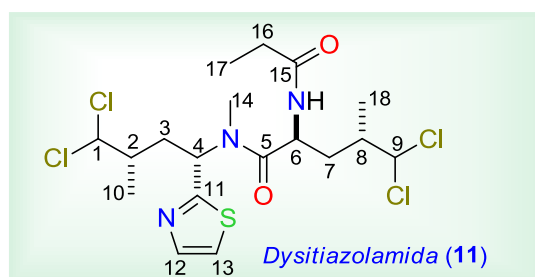


Figura 54. Resumen del procedimiento sintético utilizado en la síntesis total de dysitiazolamida (**11**).³³⁴

³³³ Breakeyman J. C., Daloze D., Deneubourg F., Lippert E., van Sande J. *New J. Chem.* **1990** 14, 705.

³³⁴ Arda A., González-Soengas R., Nieto M. I., Jiménez C., Rodríguez J. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2175.

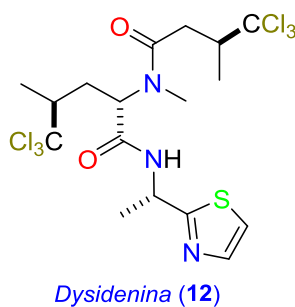
Tabla 8. Datos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de dysitiazolamida (**11**) (/ señal a más frecuencia y h señal a menos frecuencia).



Posición	δ_{H} (ppm), mult. J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	5.84 d 3.0	78.55 d
2	2.10 dddd 6.3, 2.6, 3.0, 10.3	40.84 d
3	$H_{3\text{I}}$: 2.55 ddd 2.6, 11.5, 14.3 $H_{3\text{H}}$: 2.22 ddd 4.2, 10.3, 14.3	31.18 t
4	6.21 dd 4.2, 11.5	52.05 d
5	-	172.82 s
6	5.04 ddd 2.8, 8.6, 10.4	47.03 d
7	$H_{7\text{I}}$: 1.96 ddd 2.6, 10.4, 13.7 $H_{7\text{H}}$: 1.67 ddd 2.8, 9.9; 13.7	35.19 t
8	2.27 dddd 6.7, 2.6, 3.0, 9.9	40.64 d
9	5.79 d 3.0	78.60 d
10	1.22 d 6.3	15.81 q
11	-	168.37 s
12	7.76 d 3.4	142.57 d
13	7.36 d 3.4	119.96 d
14	2.94 s	29.61 q
15	-	174.08 s
16	2.30 q 7.7	29.61 t
17	1.18 t 7.7	9.66 q
18	1.26 d 6.7	15.53 q
NH	6.33 d 8.6	

I.2.2.2.4.2 Otros compuestos aislados: *dysidenina* (**12**)

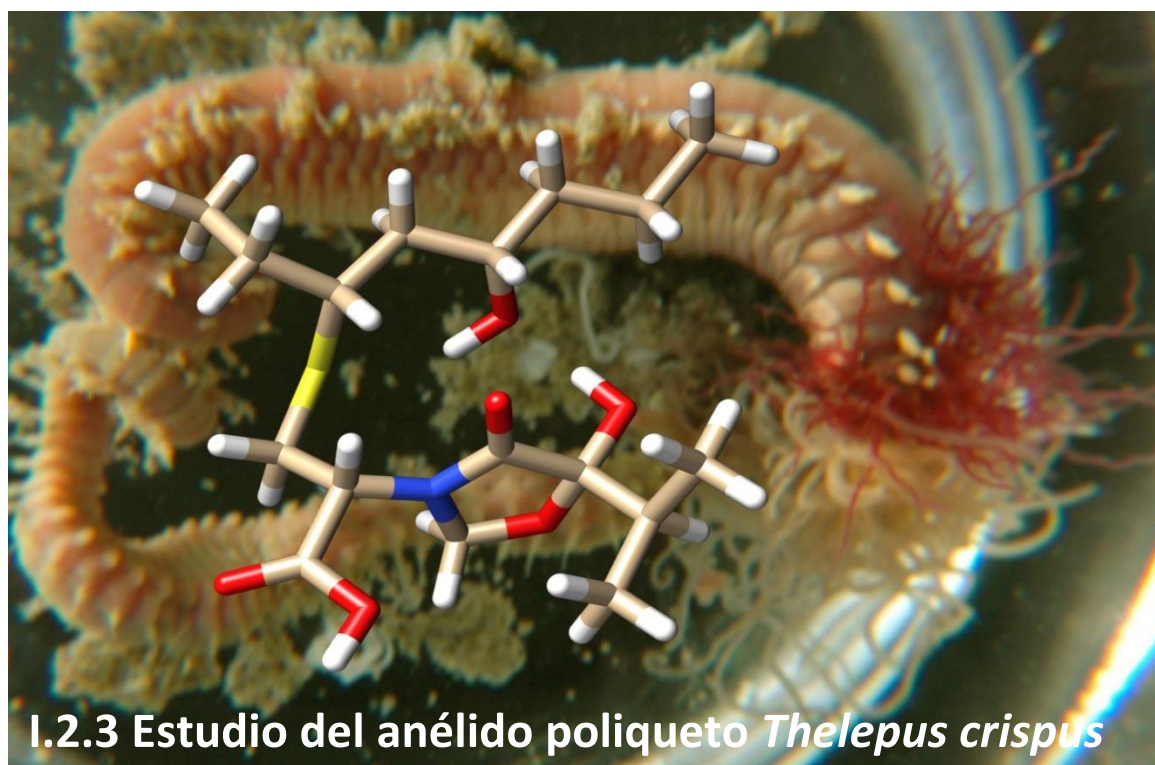
Además de dysitiazolamida (**11**), se aisló el compuesto **12** cuya estructura resultó ser la de *dysidenina*, tal como deducimos por la comparación de los datos espectroscópicos que aparecen en la bibliografía para este compuesto.³³⁵



³³⁵ Kazlauskas R., Lidgard R. O., Wells R. J. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 16, 3183.

I.2.2.2.4.3 Resultados farmacológicos.

Los compuestos **11** y **12** fueron analizados como agentes citotóxicos frente a las líneas tumorales P-388, HT-29 y A-549, no resultando ninguno de ellos activo a concentraciones menores de 10 $\mu\text{g/mL}$.



1.2.3.1 Antecedentes bibliográficos de gusanos de origen marino

Los filos Annelida y Hemicordata han sido estudiados desde el punto de vista químico, aislándose como metabolitos secundarios más importantes bromofenoles,³³⁶ indoles halogenados,³³⁷ clorinas,³³⁸ alcaloides diesteroidales (cefalostatinas),³³⁹ ortoantraquinonas,³⁴⁰ polipéptidos,³⁴¹ pigmentos,³⁴² aminoácidos,³⁴³ nucleósidos y derivados de ácidos grasos³⁴⁴. Se ha demostrado que algunos de estos compuestos actúan como feromonas sexuales, mientras que otros se cree que actúan como mecanismo de defensa química contra sus depredadores.³⁴⁵

Tabla 9. Diferentes tipos de compuestos naturales aislados de gusanos de origen marino.

Filo	Clase	Orden	Familia	Nombre científico	Compuestos
Annelida	Policaeta	Terebellida	Terebellidae	<i>Thelepus setosus</i> <i>Thelepus crispus</i> <i>Thelepus sp.</i>	Fenoles polibromados idem, thelepin, hemoglobina
Annelida	Policaeta	Eunicida	Oeonidae	<i>Halla parthenopeia</i>	Antraquinonas
Echiura	Echiura	Boneilloinea	Bonelliidae	<i>Bonella viridis</i>	Chlorin
Hemicordata	Enteropneusta			<i>Acorn sp</i>	Fenoles e indoles polibromados
Nemertea	Anopla	Heteronemertea	Lineidae	<i>Cerebratulus lacteus</i>	Fenoles polibromados
Annelida	Polychaeta	Terebellida	Cirratulidae	<i>Cirriformia tentaculata</i>	Pirrolsulfamatos
Arthropoda	Pterobranquia	Mesostigmata	Trachyuropodidae	<i>Cefalodiscus gilchristi</i>	Cefalostatinas 1-15, 18,19

³³⁶ a) King G. M. *Nature* (London) **1986**, 323, 257. b) Higa T., Fujiyama T., Scheuer P. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **1980**, 65B, 525. c) Higa T., Okuda R. K., Servens R. M., Scheuer, P. J., He C.-H., Chang F., Clardy J. *Tetrahedron* **1987**, 43, 1063. d) Gribble G. W. *J. Chem. Educ.* **1994**, 71, 907. e) Corgiat J. M., Dobbs F. C., Burger M. W., Scheuer P. J. *Comp Biochem Physiol* **1993**, 106B, 83. f) Goerke H., Emrich R., Weber K., Duchene J. C. *Comp. Biochem. Physiol.* **1991**, 99B, 203. g) Lincoln D. E., Fielman E., Marinelli K. T., Woodin R. L., Sarah A. *Bioch. Syst. Ecol.*, **2005**, 33, 559.

³³⁷ a) Higa T., Scheuer P. J. *Naturwissenschaften* **1975**, 62, 395-396. b) Higa T., Ichiba T., Okuda R. K. *Experientia* **1985**, 41, 1487. c) Higa T., Scheuer J. *Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 2246. d) Higa T., Scheuer P. J. *Tetrahedron*, **1975**, 31, 2379.

³³⁸ a) Petter A., Ballantine J. A., Ferrito V., Sccarini V., Psaila A. F., Schembri P. J. *Chem. Soc. Chem. Comm.* **1976**, 999. b) Ballantine J., Psaila A. F., Petter A., Murray-Rust P., Ferrito V., Schembri P. J. *Chem. Soc. Perkin 1*, **1980**, 1080.

³³⁹ a) Pettit G. R., Inoue M., Kamano Y., Dufresne C., Christie N., Niven M. L., Herald D. L. *J. Chem Soc. Chem. Comm.* **1988**, 865, *Corrigendum* **1988**, 1440. b) Pettit G. R., Inoue M., Kamano Y., Herald D. L., Arm C., Dufresne C., Christie, N. D., Schmidt J. M., Doubek, D. L., Krupa, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2006. c) Pettit G. R., Kamano Y., Dufresne C., Inoue M., Christie N. D., Schmidt J. M., Doubek D. L. *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 1509. d) Pettit G. R., Kamano Y., Inoue M., Dufresne C., Boyd M. R., Herald D. L., Christie N. D. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 429. e) Pettit G. R., Xu J. P., Williams M. D., Christie N. D., Doubek D. L., Schmidt J. M., Boyd M. R. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 52. f) Pettit G. R., Xu J. P., Ichihara Y., Williams M. D., Boyd M. R. *Can. J. Chem.* **1994**, 72, 2260. g) Ganesan A. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1996**, 35, 611. h) Ganesan A. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1996**, 18, 875. i) Pettit G. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 812.

³⁴⁰ a) Prota G., D'Agostino M., Misuraca G. *J. Chem. Soc. Perkin 1*, **1972**, 1614. b) Cimino G., De Rosa S., Sodano G. *J. Nat. Prod.* **1985**, 48, 828.

³⁴¹ a) Takahashi T., Furukawa Y., Muneoka Y., Matsushima O., Ikeda T., Fujita T., Minakata H., Nomoto K. *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, 110C, 297. b) Kern W. R. *Handbook of biological peptides* **2006**, 397.

³⁴² Pelter A., Ballantine, J. A., Murray-Rust P., Ferrito V., Psaila A. F. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 21, 1881.

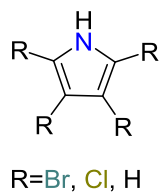
³⁴³ Zeek E., Harder, T., Beckman, M. *Chemoecology* **1998**, 8, 77-84.

³⁴⁴ Bartels- Hardege H. D., Hardege J. D., Zeek E., Muller C., Wu B. L., Zhu M. Y. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1996**, 201, 275.

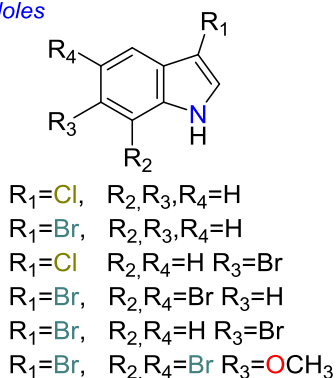
³⁴⁵ Coward J. D., Fieldman K. T., Woodin S. A. *Mar. Biol.* **2000**, 136, 993.

Algunos ejemplos de los diferentes compuestos que fueron aislados de esos organismos se muestran en la Figura 55.

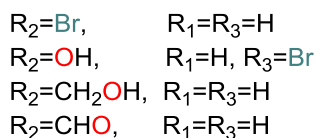
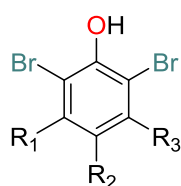
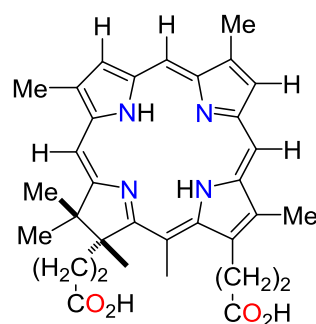
Bromopyrroles



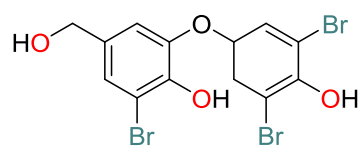
Indoles



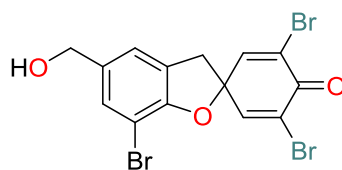
Porfinas



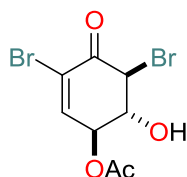
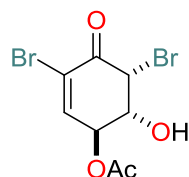
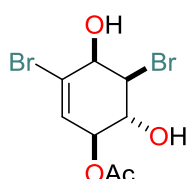
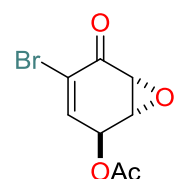
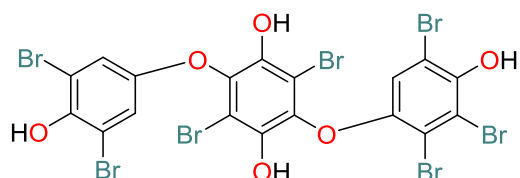
Fenoles Brominados



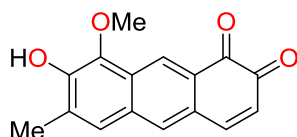
thelefenol



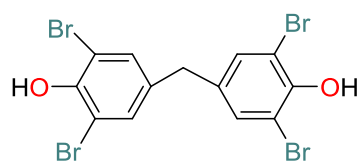
thelepin



Antraquinonas



Hidroxi-8-metoxi-6-metil-1,2-antraquinona



bis (3,5-dibromo-4-hidroxifenil)metano

Neurotoxin B-IV

AS ATWGAAYXACENNCRRKKYDLCIRCQGWAGKRGKCAAHCIQKNNCKGKCKKE

Figura 55. Estructuras de compuestos aislados de gusanos de origen marino.

Los compuestos más importantes aislados de estos organismos marinos han sido las cefalostatinas. Estas comprenden una familia de más de treinta piperazinas *bis*-esteroidales con una elevada actividad citotóxica. Las cefalostatinas 1-6 fueron aisladas del hemicordado africano *Cephalodiscus gilchristi* por primera vez por el grupo del profesor Pettit en 1988,³⁴⁶ a las que le siguieron en años posteriores las cefalostatinas 7-9,³⁴⁷ las cefalostatinas 10-15³⁴⁸ y las cefalostatinas 16-19.³⁴⁹ Es de resaltar que la cefalostatina 1 es uno de los más potentes inhibidores del crecimiento de células cancerígenas con valores de ED₅₀ entre 0.1–0.001 μ M.

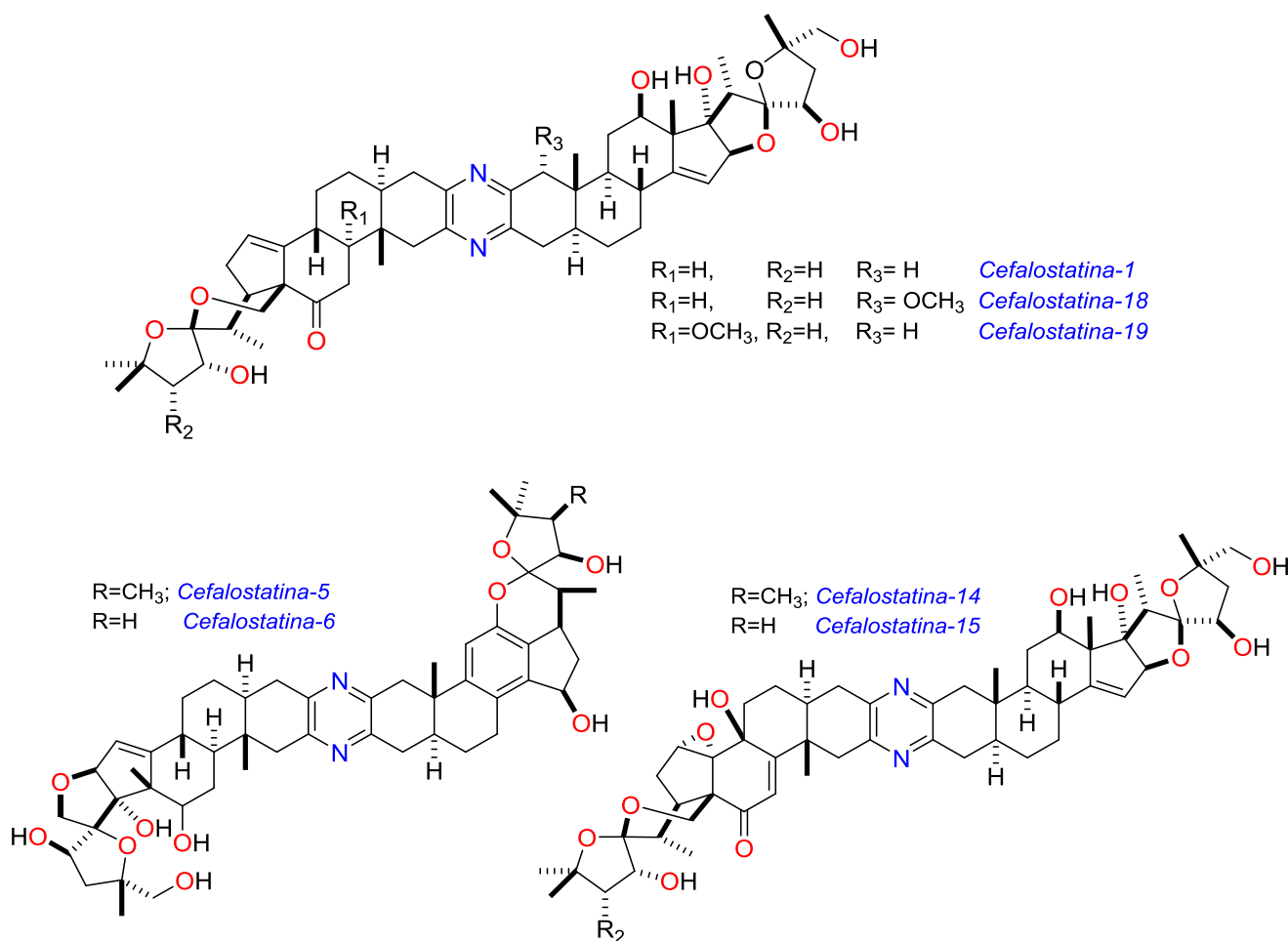


Figura 56. Compuestos aislados del hemicordado *Cephalodiscus gilchristi*.

³⁴⁶ Pettit G. R., Kamano Y., Dufresne C., Inoue M., Christie N. D., Schmidt J. M., Doubek D. L. *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 1509.

³⁴⁷ Pettit G. R., Kamano Y., Inoue M., Dufresne C., Boyd M. R., Herald C. L., Schmidt J. M., Doubek D. L., Christie N. D. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 429.

³⁴⁸ a) Pettit G. R., Xu J. P., Williams M. D., Christie N. D., Doubek D. L., Schmidt J. M. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 52. b) Pettit G. R., Ichihara Y., Xu J. P., Boyd M. R., Williams M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1507. c) Pettit, G. R., Xu, J. P., Ichihara Y., Williams M. D. *Can. J. Chem.* **1994**, 72, 2260.

³⁴⁹ a) Pettit G. R., Xu J. P., Schmidt J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2027. b) Pettit G. R., Tan R., Xu J. P., Ichihara Y., Williams M. D., Boyd M. R. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 955.

Se conocen varias síntesis de la cefalostatina 1,³⁵⁰ de las cefalostatinas 7 y 12,³⁵¹ de la cefalostatina 21,³⁵² de la cefalostatina 22³⁵³ y se han preparado numerosos análogos.³⁵⁴

Dado que estos organismos no han sido estudiados tan exhaustivamente como los de otros filos marinos, como las esponjas, tunicados, briozoos, algas, corales blandos u otros invertebrados, el estudio de gusanos de origen marino puede ser muy prometedor en el descubrimiento de nuevos tipos de esqueletos carbonados.

1.2.3.1.1 Antecedentes bibliográficos del anélido poliqueto *Thelepus crispus*

Se conocen varios estudios del género *Thelepus*, e incluso en la bibliografía existen dos publicaciones sobre estudios químicos de *Thelepus crispus*, de los que se han publicado el aislamiento de fenoles polibromados del tipo thelefenol y thelephin (ver Figura 55) así como de hemoglobina.³⁵⁵

³⁵⁰ a) LaCour T. G., Guo C., Bhandaru S., Boyd M. R., Fuchs, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 692. b) Fortner D. C., Kato, D.; Tanaka Y.; Shair M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 275.

³⁵¹ Jeong J. U., Guo C., Fuchs P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2071.

³⁵² Pettit G. R., Mendonça R. F., Knight J. C., Pettit R. K. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 1922.

³⁵³ Pettit G. R., Moser B. R.; Mendonça R. F., Knight J. C., Hogan F. J. *Nat. Prod.* **2012**, 75, 1063.

³⁵⁴ Poza J. J., Rodríguez J., Jiménez C. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 58.

³⁵⁵ Sobre *Thelepus crispus*: a) Lalonde S. V., Dafoe, L. T., Pemberton S. G., Gingras M. K., Konhauser, K. O. *Chem. Geology* **2010**, 271, 44. b) Lincoln D. E., Fielman K. T., Marinelli R. L., Woodin S. A. *Biochem. Syst. Ecology* **2005**, 33, 559. c) Garlick R. L., Terwilliger R. C. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **1974**, 47(3B), 543. Sobre el género *Thelepus*: d) Goerke H., Emrich R., Weber K., Duchene J. *Biochem. Physiol., Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **1991**, 99B, 203.

1.2.3.2 Estudio químico del anélido poliqueto *Thelepus crispus*

1.2.3.2.1 Identificación y clasificación

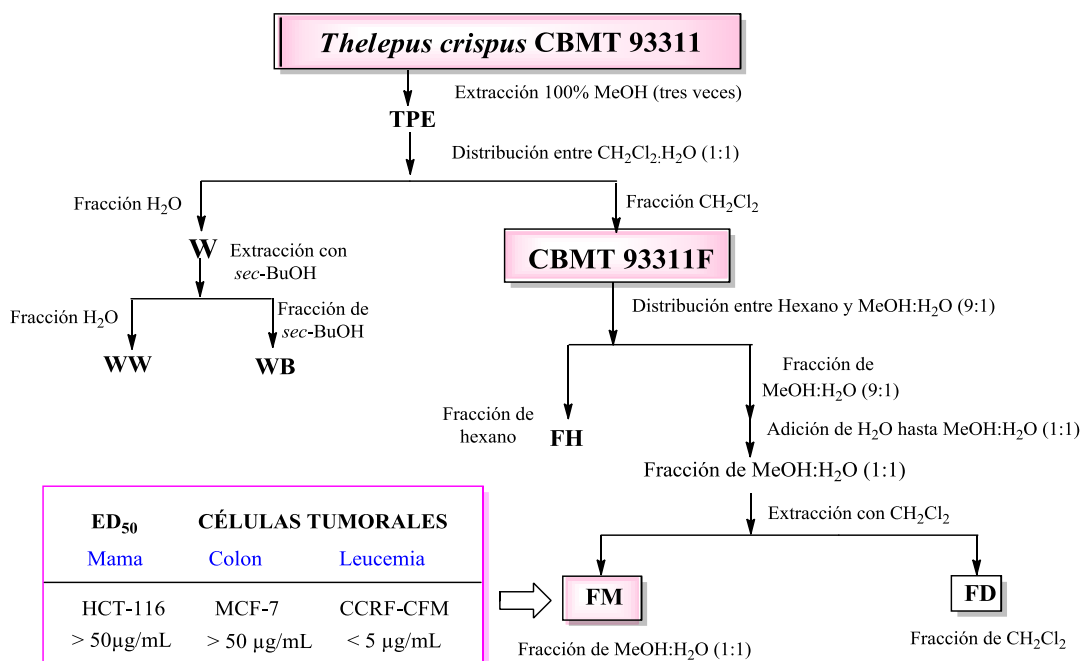


Este anélido poliqueto se recolectó en el año 1992 en el Pacífico Norte cerca de Friday Harbor (estado de Washington en EEUU) y fue taxonómicamente clasificado por el Doctor Gregg Dieztman del Instituto White Point Biomarine de Washington (EEUU) como *Thelepus crispus* (filo Anelida, clase Polichaeta, orden Sedentariate, familia Terebellidae, número de clasificación CBMT 93311). Mide unos 15 cm y socava pequeños túneles en la arena, en conchas, o en lodos introduciéndose en ellos. Tiene unos filamentos a lo largo de los segmentos de su cuerpo por los que

saca unos tubos a través de los cuales se alimenta. Este anélido poliqueto marino fue seleccionado para su estudio porque una de las fracciones polares obtenidas a partir de su extracto metanólico mostró actividad selectiva contra las células tumorales de leucemia CCRF-CFM con unos valores de inhibición de ED₅₀ menores de 5 µg/mL.

1.2.3.2.2 Extracción y fraccionamiento

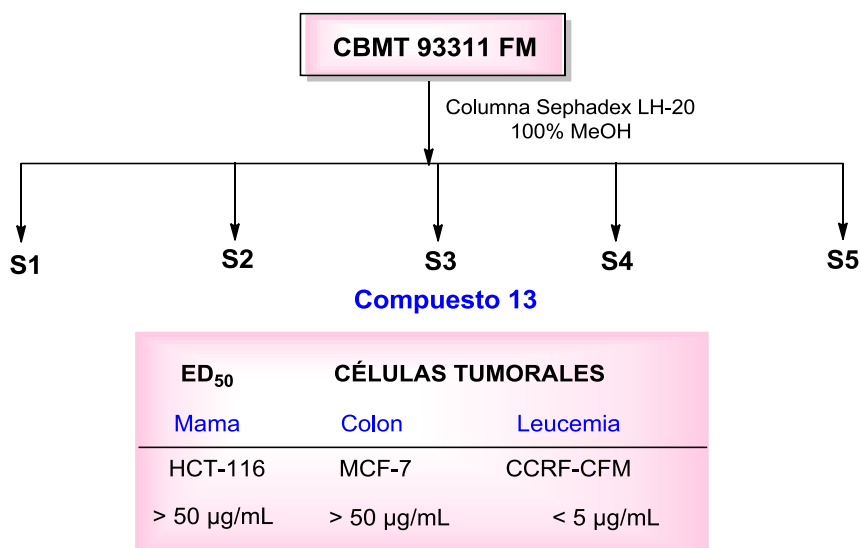
Los organismos se extrajeron repetidas veces con metanol, se eliminó el disolvente y posteriormente se distribuyó entre agua (fracción W) y diclorometano (fracción F). La fracción acuosa (W) se extrajo con sec-butanol, mientras que la de diclorometano (F) se continuó fraccionando con disolventes de diferente polaridad hasta llegar a las dos fracciones denominadas **FD** (diclorometano) y **FM** (MeOH:H₂O 1:1) (Esquema 8).



Esquema 8. Procedimiento de extracción y fraccionamiento del anélido poliqueto *Thelepus crispus*.

I.2.3.2.3 Aislamiento y purificación

El fraccionamiento bioguiado mostró una citotoxicidad selectiva contra CCRF-CFM células de leucemia ($ED_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$) en la fracción **FM**. Esta fracción **FM** se separó a continuación en una columna de Sephadex LH-20 eluída con MeOH dando lugar a cinco fracciones de las cuales la CBMT93311 **FM** S3 rindió un sólido amorfo óptimamente activo (α -10.4° c 0.016 MeOH) que resultó ser un nuevo compuesto natural.



Esquema 9. Procedimiento de separación de la fracción **FM** del anélido poliqueto *Thelepus crispus*.

I.2.3.2.4 Determinación estructural

Del anélido poliqueto marino *Thelepus crispus* se aisló el compuesto **13** con la estructura mostrada en la Figura 57 y cuya determinación estructural se describe a continuación.

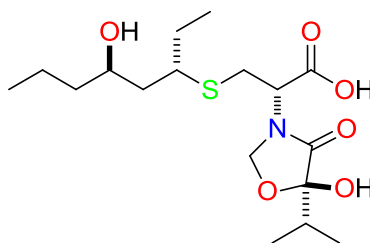


Figura 57. Estructura de thelepamida (**13**).

La elucidación estructural del compuesto **13** se realizó con un detallado estudio de espectroscopia de RMN (^1H y ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, HMBC, HMQC, NOESY, ROESY, *J*-HMBC, HETLOC y HSQC-HECADE), espectrometría de masas FAB de baja y alta resolución en sus modos de ion positivo e ion negativo.

I.2.3.2.4.1 *Thelepamida* (13)

El estudio de los espectros de RMN de ^{13}C , DEPT-135 y DEPT-90 del compuesto **13** permitieron deducir la presencia de 17 carbonos correspondientes a 4 grupos metilo, 6 grupos metileno, 4 grupos metino y 3 carbonos cuaternarios, resultando una fórmula APT de $\text{C}_{17}\text{H}_{28}$. Esta información, conjuntamente con la de sus espectros de masas de alta resolución, utilizando el modo ionización FAB, permitió establecer su fórmula molecular como $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NO}_6\text{S}$. En su modo de ión negativo, el espectro de masas (Figura 58) mostró el ión pseudomolecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 376.1808 (Δ 1.4 mmu), mientras que en el modo de ión positivo se observaron los iones pseudomoleculares $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 400.1781 (Δ 1.1 mmu), y $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ a m/z 422.1594 (Δ 0.5 mmu). Adicionalmente en el espectro de masas (+)-FAB de baja resolución se observaron intensos iones pseudomoleculares a m/z 416 $[\text{M}+\text{K}]^+$, m/z 438 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$ y m/z 454 $[\text{M}-\text{H}+2\text{K}]^+$ que parecen indicar la gran afinidad por los cationes Na y K. El espectro de IR indicó la presencia de un grupo hidroxilo (3336 cm^{-1}), así como dos grupos carbonilo de ácido carboxílico (1697 cm^{-1}) y de amida (1613 cm^{-1}).

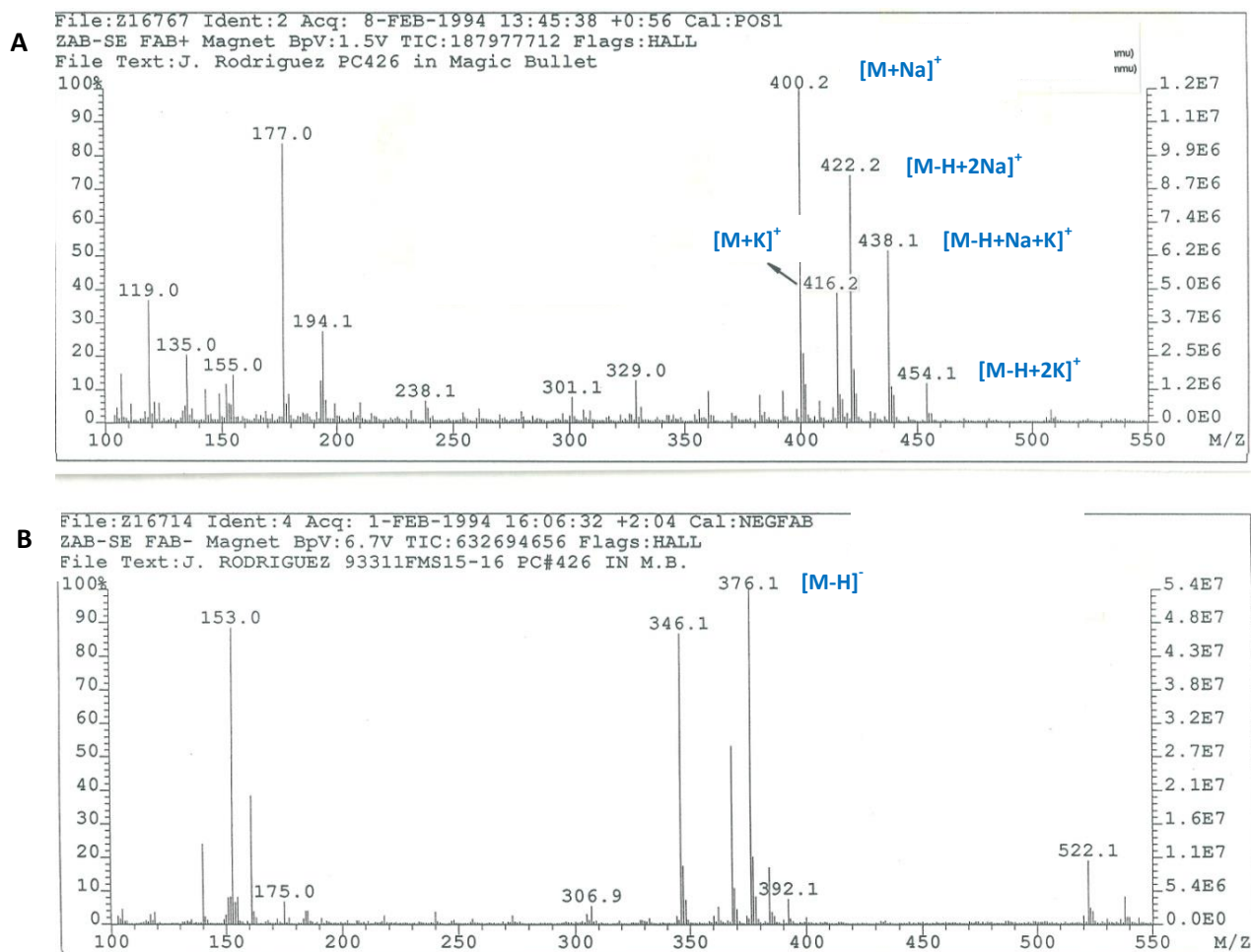


Figura 58. Espectros de masas FAB en modo positivo (A) y negativo (B) del compuesto **13**.

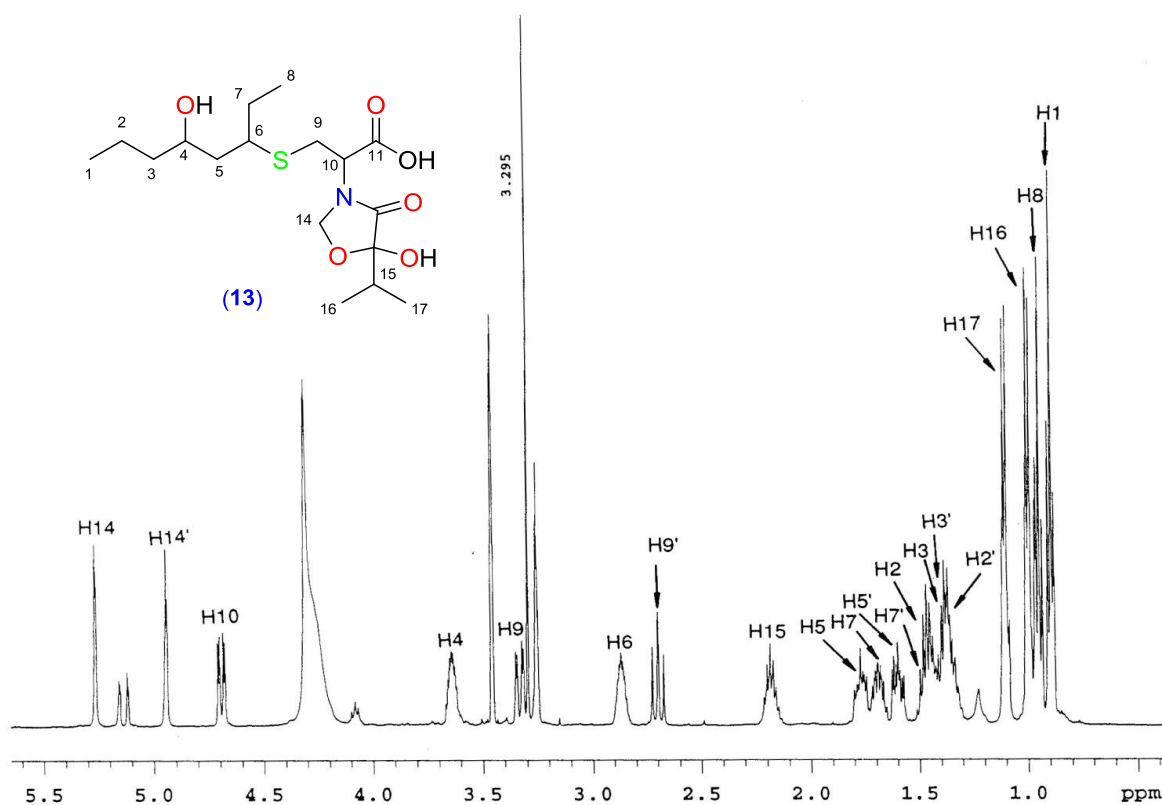


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) del compuesto 13.

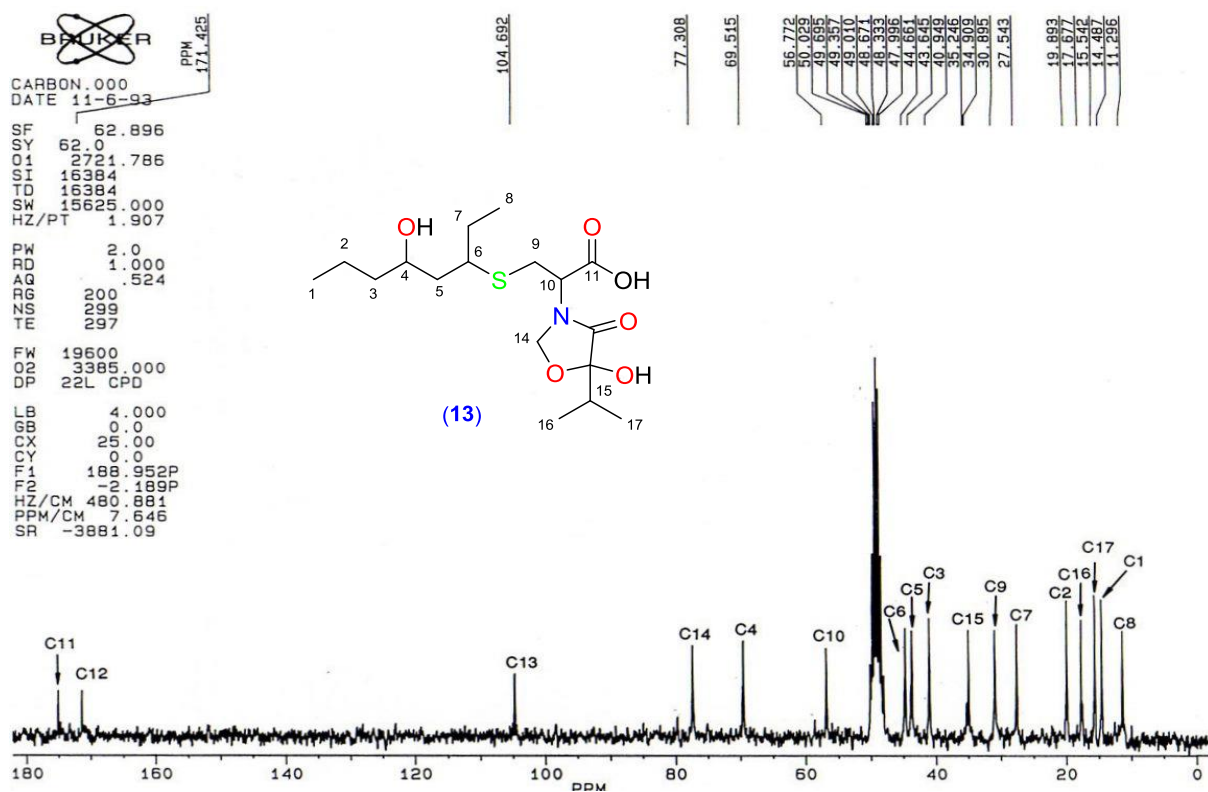


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C (62.3 MHz, CD_3OD) del compuesto 13.

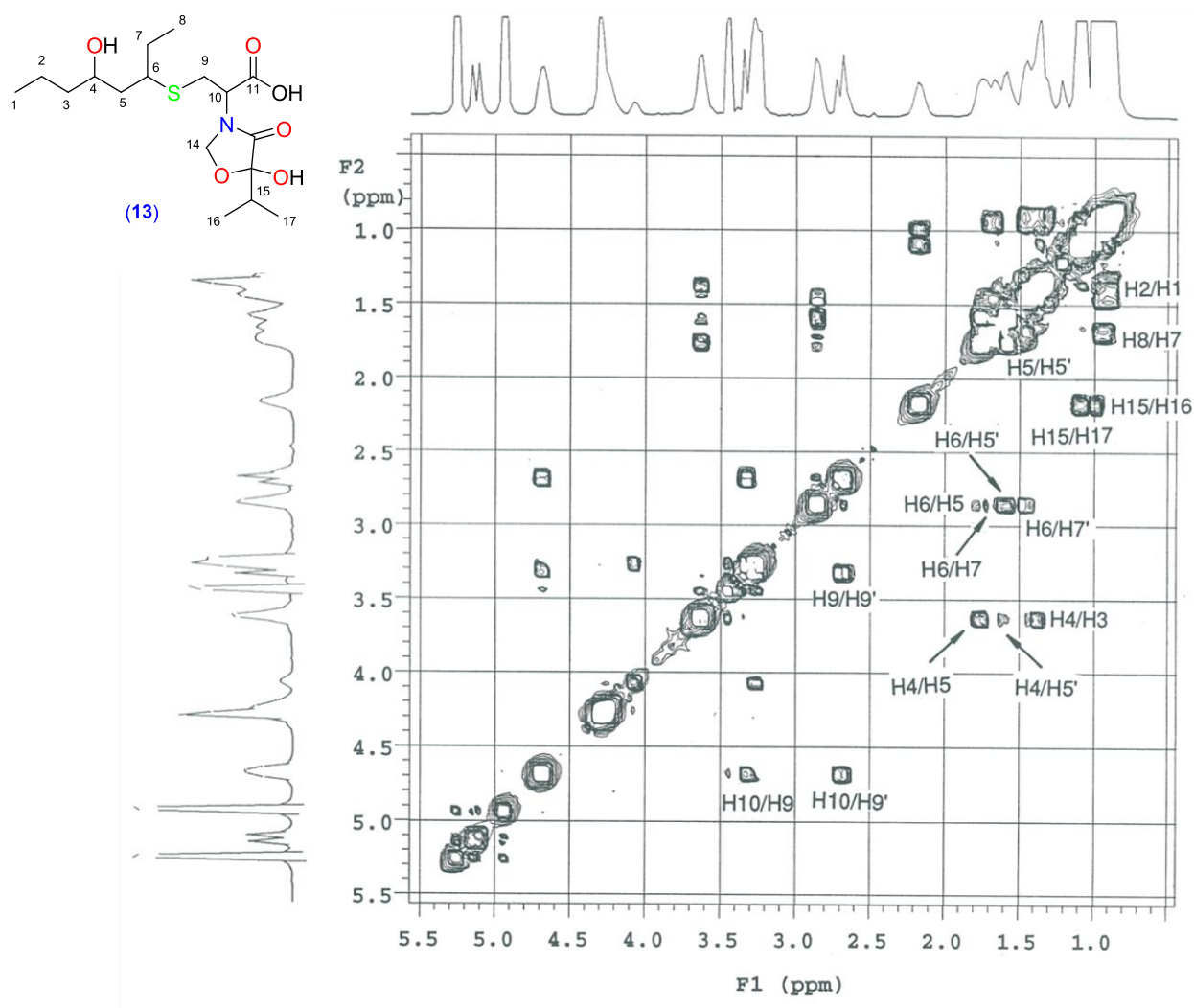


Figura 61. Espectro ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3OD) del compuesto **13**.

A partir de los espectros de RMN de ^1H (Figura 59), ^{13}C (Figura 60) y los experimentos bidimensionales de correlación ^1H - ^1H -COSY (Figura 61) y ^1H - ^{13}C -HMQC (Figura 63) del compuesto **13** se obtuvieron una serie de sistemas de espín a partir de los cuales se pudieron deducir las siguientes conclusiones:

- El desplazamiento químico de un grupo metínico a δ_c 69.5 fue indicativo de un carbono unido a oxígeno, mientras que el que resonó a δ_c 44.7 (CH) parece indicar la existencia de un grupo metínico unido al átomo de azufre que nos indicó su fórmula molecular.
- El desplazamiento químico a δ_c 30.9 (CH_2) puede ser indicativo de un grupo metileno unido a azufre.
- El carbono metilénico a δ_c 77.3 presentó una constante de acoplamiento $^1J_{\text{CH}}$ de 165 Hz, que junto con los desplazamientos químicos de sus protones correspondientes a δ_H 4.94 (d, $J = 2.5$ Hz) y 5.26 (d, $J = 2.5$ Hz) sugirió que estaba unido a átomos de oxígeno y nitrógeno.
- El desplazamiento químico del carbono cuaternario a δ_c 104.7 indicó que debía de estar unido a dos átomos de oxígeno.

e) Por último, los carbonos cuaternarios a δ_c 174.3 y 171.4 se asignaron a dos grupos carbonilos de un ácido carboxílico y un grupo amida, respectivamente.

De este forma se dedujeron los fragmentos **A-G** mostrados en la Figura 62 que permitieron además asignar cada uno de los protones con el correspondiente carbono al que está unido.

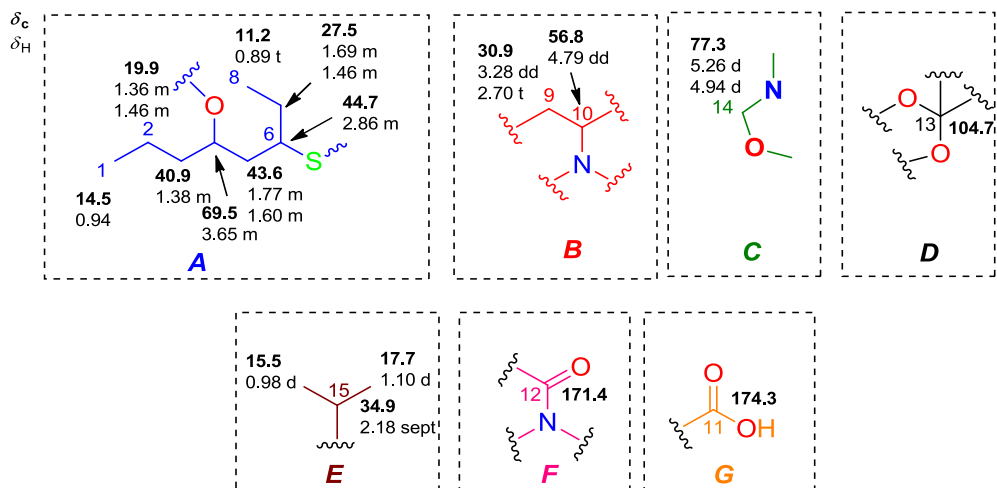


Figura 62. Fragmentos deducidos a partir de los sistemas de espín obtenidos de los espectros de RMN y mediante los experimentos HMQC y ^1H - ^1H COSY del compuesto **13**.

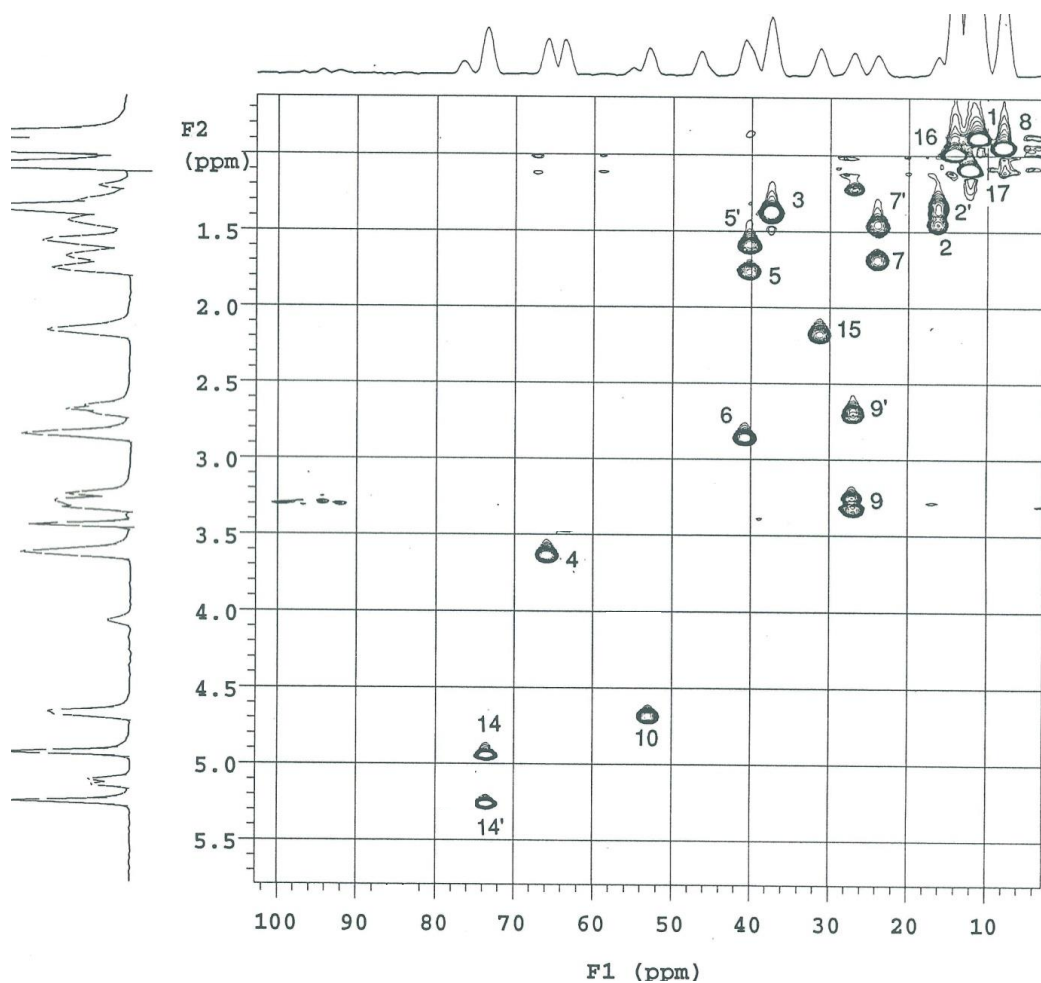


Figura 63. Experimento HMQC (500 MHz, CD_3OD) de thelephamida (**13**).

La conexión de los sistemas de espín **A-G** se realizó mediante el experimento HMBC (Figura 65) que mostró las correlaciones descritas en la Figura 64.

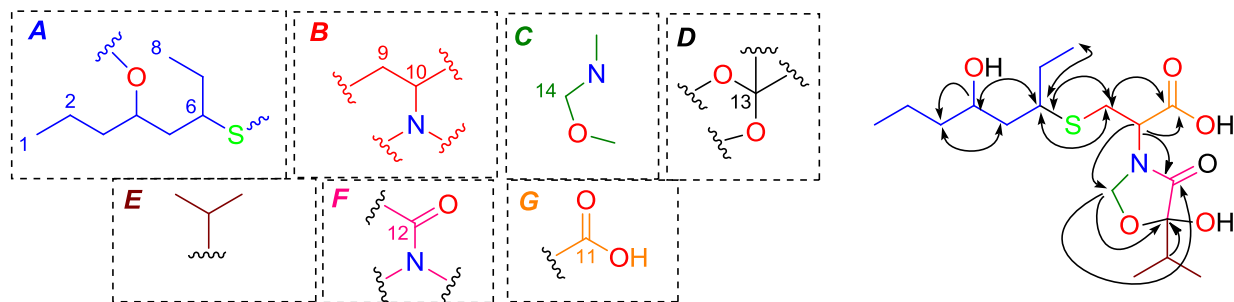


Figura 64. Correlaciones del compuesto **13** observadas en el experimento de RMN HMBC de **13**.

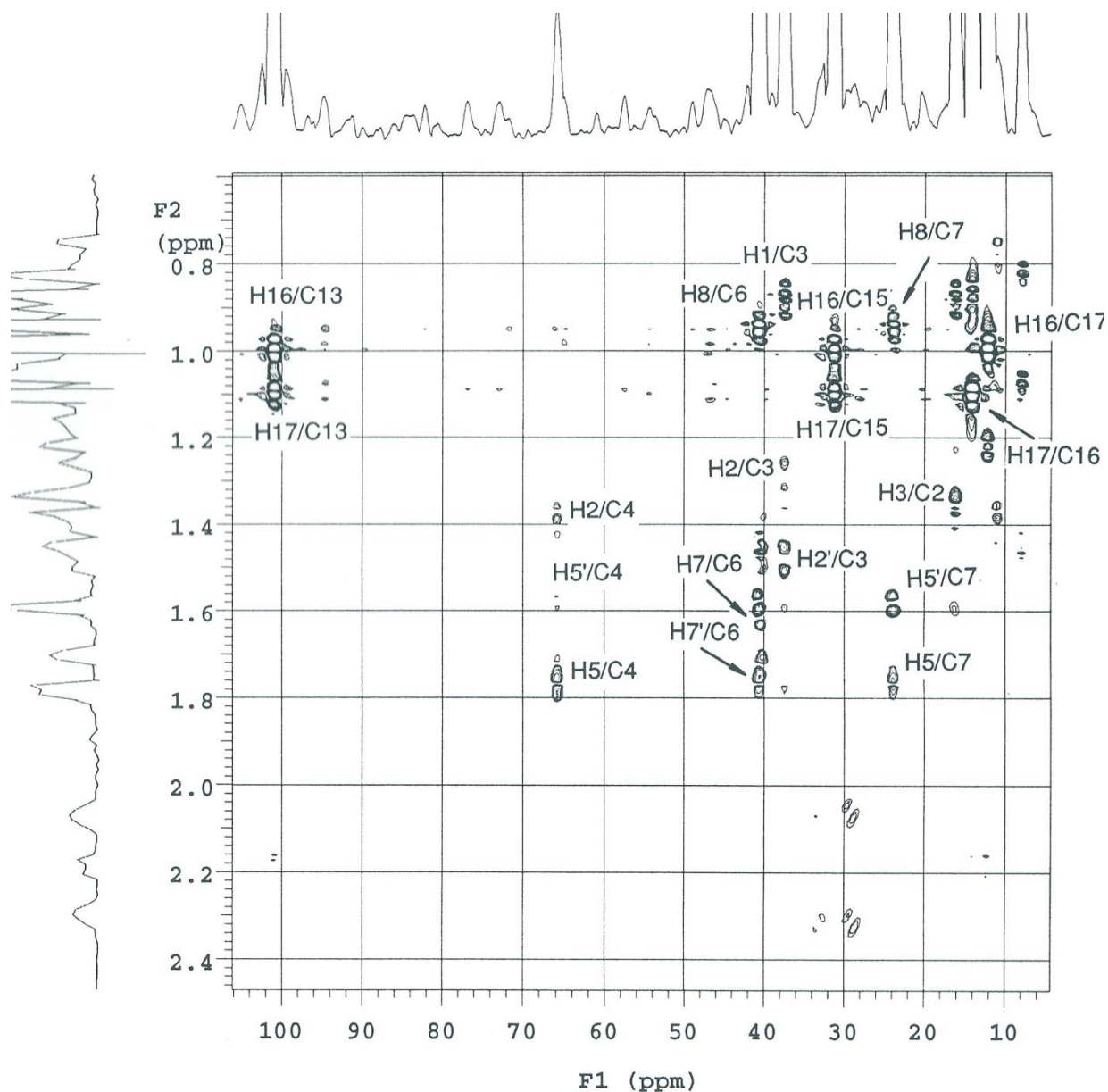
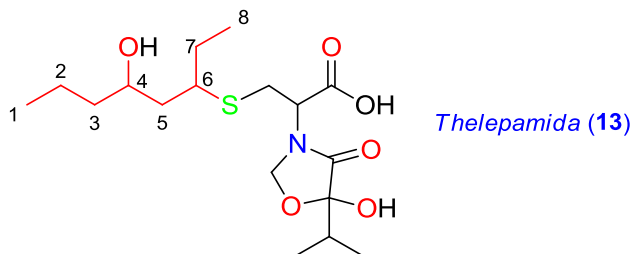


Figura 65. Experimento HMBC (500 MHz) del compuesto **13** con las correlaciones asignadas.

I.2.3.2.5 Determinación de la estereoquímica relativa de thelepamida

El fragmento C1-C8 presente en thelepamida (**13**) es un claro ejemplo de un sistema 1,3 quiral, cuya estereoquímica relativa puede ser determinada por el análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento (JBA) también conocido como método de Murata.³²⁹



Mediante los experimentos *J*-HMBC, HETLOC y HSQC-HECADE del compuesto **13** se obtuvieron las constantes de acoplamiento heteronucleares J_{CH} entre los carbonos y protones entorno a los enlaces C4-C5 y C5-C6, consiguiéndose los valores mostrados en la Figura 66. Debido al gran solapamiento de las señales en sus espectros de RMN de protón, no fue posible determinar las constantes de acoplamiento homonucleares protón-protón, por lo que el estudio se centró en las constantes heteronucleares carbono-protón a dos ($^2J_{CH}$) o tres ($^3J_{CH}$) enlaces.

Se valoraron las constantes de acoplamiento 2J y 3J utilizando el siguiente criterio.³⁵⁶

$$^3J_{H-H} \begin{cases} 0-4 \text{ Hz pequeña (S)} \\ 5-9 \text{ Hz media (M)} \\ 10-16 \text{ Hz grande (L)} \end{cases} \quad ^3J_{C-H} \begin{cases} 0-3 \text{ Hz pequeña (S)} \\ 4-5 \text{ Hz media (M)} \\ 6-9 \text{ Hz grande (L)} \end{cases} \quad ^2J_{C-H} \begin{cases} 0-2 \text{ Hz pequeña (S)} \\ 3-4 \text{ Hz media (M)} \\ 5-6 \text{ Hz grande (L)} \end{cases}$$

$^2J_{(C4H5l)} = -6.0 \text{ Hz}$	L	$^3J_{(C4H6)} = +3.0 \text{ Hz}$	S
$^2J_{(C4H5h)} = -2.0 \text{ Hz}$	S	$^2J_{(C6H5l)} = -4.6 \text{ Hz}$	L
$^3J_{(C6H4)} = +2.5 \text{ Hz}$	S	$^2J_{(C6H5h)} = -4.0 \text{ Hz}$	L
$^3J_{(C3H5h)} = +1.8 \text{ Hz}$	S	$^3J_{(C7H5l)} = +4.0 \text{ Hz}$	L
$^3J_{(C3H5l)} = +3.1 \text{ Hz}$	S	$^3J_{(C7H5h)} = +2.1 \text{ Hz}$	S

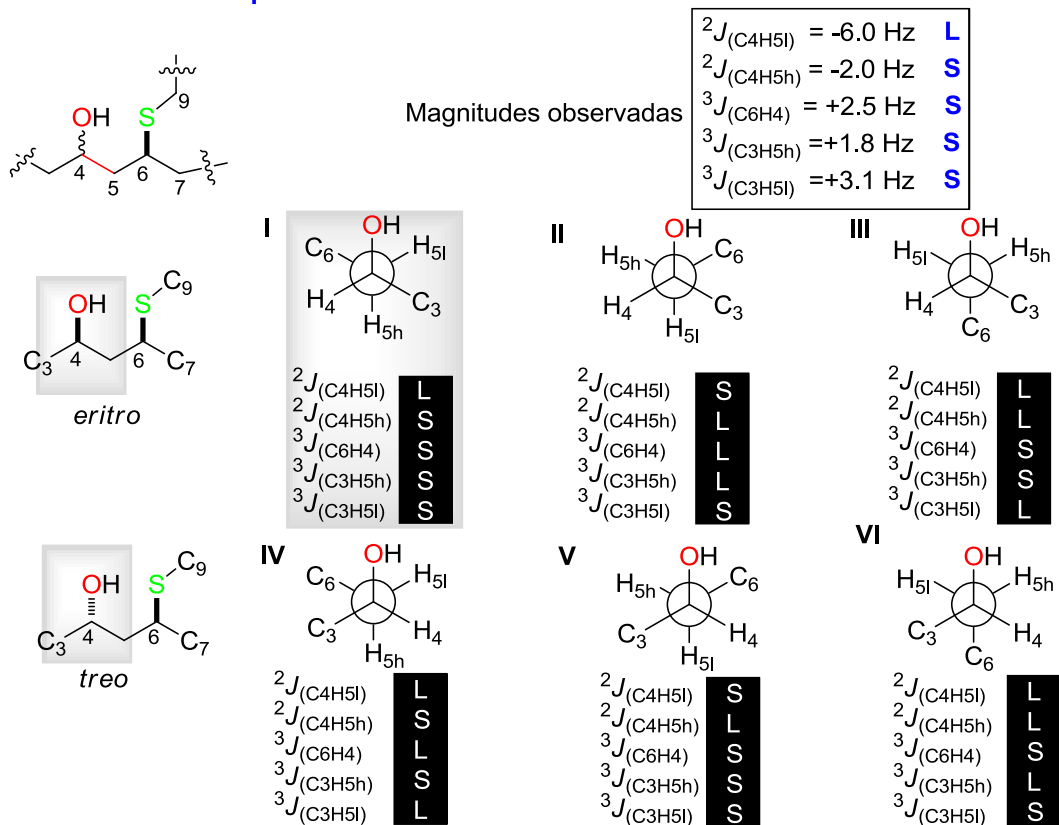
Figura 66. Valores de las constantes heteronucleares J_{CH} (denotados como S=pequeño y L = grande) obtenidos de los experimentos *J*-HMBC, HETLOC y HSQC-HECADE del compuesto **13**.

A continuación, se calcularon las constantes de acoplamiento heteronucleares J_{CH} teóricas entre los mismos carbonos y protones estudiados en los experimentos de RMN del compuesto **13**.

En la Figura 67 se representan los doce confórmeros alternados resultantes para cada una de las configuraciones *eritro* y *treo* del fragmento a determinar su estereoquímica relativa, con las constantes de acoplamiento esperadas en cada uno de ellos. Se asumió que la influencia del azufre en el valor de dichas constantes era similar al del oxígeno.

³⁵⁶ Crews P., Rodríguez J., Jaspars M. Organic Structure Analysis. Oxford University Press. New York **2010**.

Confórmeros alternados para el enlace C4-C5



Confórmeros alternados para el enlace C5-C6

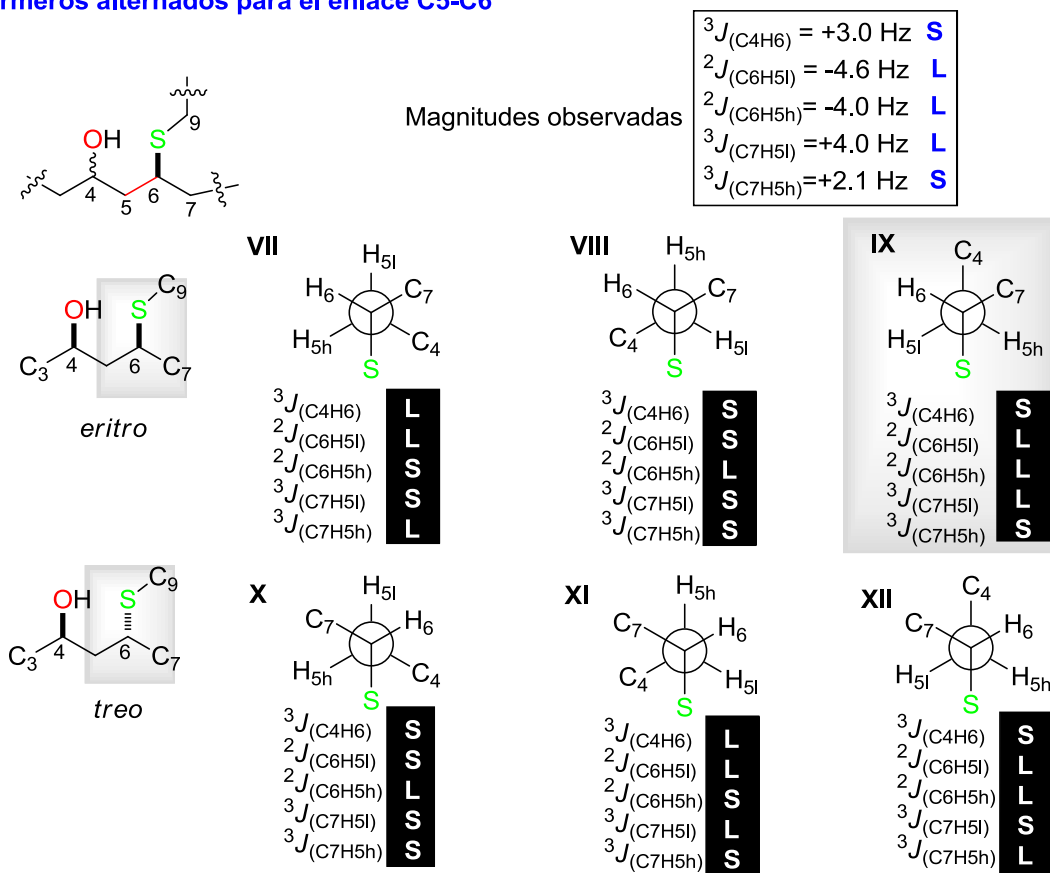


Figura 67. Confórmeros alternados entorno a los enlaces C4-C5 y C5-C6.

Del análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento (JBA) se deduce que el conformero **I**, correspondiente a la configuración *eritro*, es el único en el que las constantes experimentales del compuesto **13**, concuerdan cualitativamente con los valores clasificados como grandes/pequeños (**L/S**) esperados para cada uno de los 6 conformeros alternados de las configuraciones *eritro* y *treo* entorno al enlace C4-C5. Repitiendo el mismo proceso entorno al enlace C5-C6, se concluyó que sólo coincidían dichos valores en el conformero **IX**, correspondiente a la configuración *eritro*. Combinando la información obtenida entorno a esos dos enlaces se pudo determinar que la estereoquímica relativa entre los centros quirales de los carbonos C4 y C6 es *sin*, tal como se muestra en la Figura 68.

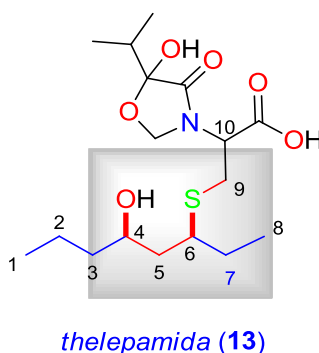


Figura 68. Estereoquímica relativa de los centros quirales C4 y C6 del fragmento C1-C8 en thelepamida (**13**) establecida por el método de Murata.

Una vez establecido la estereoquímica relativa *sin* entre C4 y C6, el siguiente paso consistió en estudiar la estereoquímica relativa de los centros quirales de los carbonos C10 y C13.

En primer lugar, se realizó un experimento NOESY del compuesto **13** con un tiempo de mezclatm de 900 ms (Figura 69), en donde se observaron correlaciones nOe claves entre el H6 y los protones H10 y H4, que indicaron que todos ellos se encuentran del mismo lado de la molécula. Adicionalmente, los siguientes datos espectroscópicos sugieren la existencia de una restricción rotacional entorno al enlace C9-C10:

- La gran diferencia entre los desplazamiento químicos de los protones diasterotópicos H9 (δ_{H9l} 3.29 y δ_{H9h} 2.70).
- Las correlaciones nOe observadas en el experimento NOESY de **13** entre H9h a δ_{H9h} 2.70 y H14h δ_{H14h} 4.94 y entre H9l a δ_{H9l} 3.29 y H5l a δ_{H5l} 1.77.
- Las perfectamente definidas constantes de acoplamiento entre cada uno de los protones H9 con el protón vecinal H10 ($J_{H10H9} = 3.5$ Hz y $J_{H10H9l} = 13.0$ Hz)

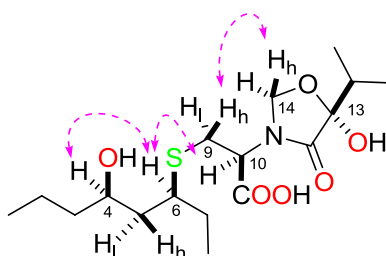


Figura 69. Correlaciones nOe observadas en experimento NOESY del compuesto **13**.

A continuación y partiendo de la configuración relativa *sin* de los centros quirales C4 y C6 como 4*R** y 6*S**, los cuatro posibles diastereoisómeros resultantes entorno a los otros dos centros quirales C10 y C13 serían los que tienen la configuración 4*R**5*S**10*R**13*R**-(**13a**), 4*R**5*S**10*S**13*S**-(**13b**), 4*R**5*S**10*R**13*S**-(**13c**) y 4*R**5*S**10*S**13*R**-(**13d**).

Sobre cada uno de ellos se realizó un estudio de modelización molecular, sometiéndolos primeramente a una búsqueda conformacional utilizando el módulo GMMX del programa PCModel³⁵⁷ en la que se fijó una ventana energética de 2.5 Kcal/mol. Cada uno de los conformeros obtenidos de esa primera búsqueda conformacional GMMX, se optimizó posteriormente mediante un estudio DFT utilizándose el funcional Lee-Yang-Parr B3LYP con un conjunto base 6-31G(d). Una vez minimizados cada uno de los conformeros, se midieron sus energías y se seleccionaron únicamente aquellos que se encontraban dentro de la ventana energética de 2.5 Kcal/mol. Los únicos conformeros que se ajustaban a las correlaciones nOe mencionadas anteriormente (ver sus estructuras en las Figuras 75-78) fueron aquellos que poseían la configuración 4*R**5*S**10*S**13*S**-(**13b**).

Para el diastereoisómero de configuración 4*R**5*S**10*S**13*S**-(**13b**) se encontraron un total de 24 conformeros mediante el módulo GMMX, de los que sólo 8 estaban dentro del intervalo de energía de 2.5 kcal/mol. Esos 8 conformeros fueron a continuación minimizados mediante DFT observándose que en todas las estructuras minimizadas, las parejas de átomos de hidrógeno H4/H6, H6/H10, H9h/H14h y H9l y H5l se encuentran a una distancia espacial igual o menor de 5 Å, lo que explicaría las correlaciones nOe observadas en el experimento ¹H-¹H NOESY. Además, en todos ellos se pueden observar la existencia de enlaces hidrógeno intramoleculares entre los protones y los oxígenos de los grupos hidroxilos, encontrándose a una distancia espacial igual o menor de 2.5 Å, lo que explicaría tanto restricción rotacional entorno al enlace C9-C10, como la rigidez que muestra la molécula.

RMN NOEs observados:

H4-H6
H6-H10
H10-H14

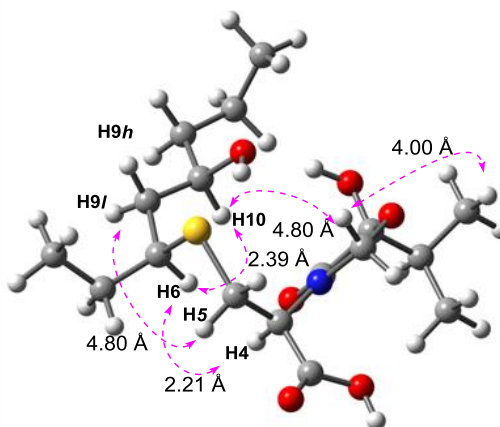
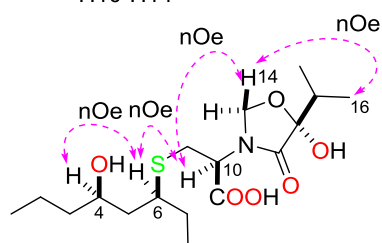


Figura 70. Correlaciones NOESY y distancias entre los átomos clave en uno de los conformeros minimizados del diastereoisómero de configuración 4*R**5*S**10*S**13*S**-(**13b**).

³⁵⁷ PC Model Version 9.3. Serena Software.

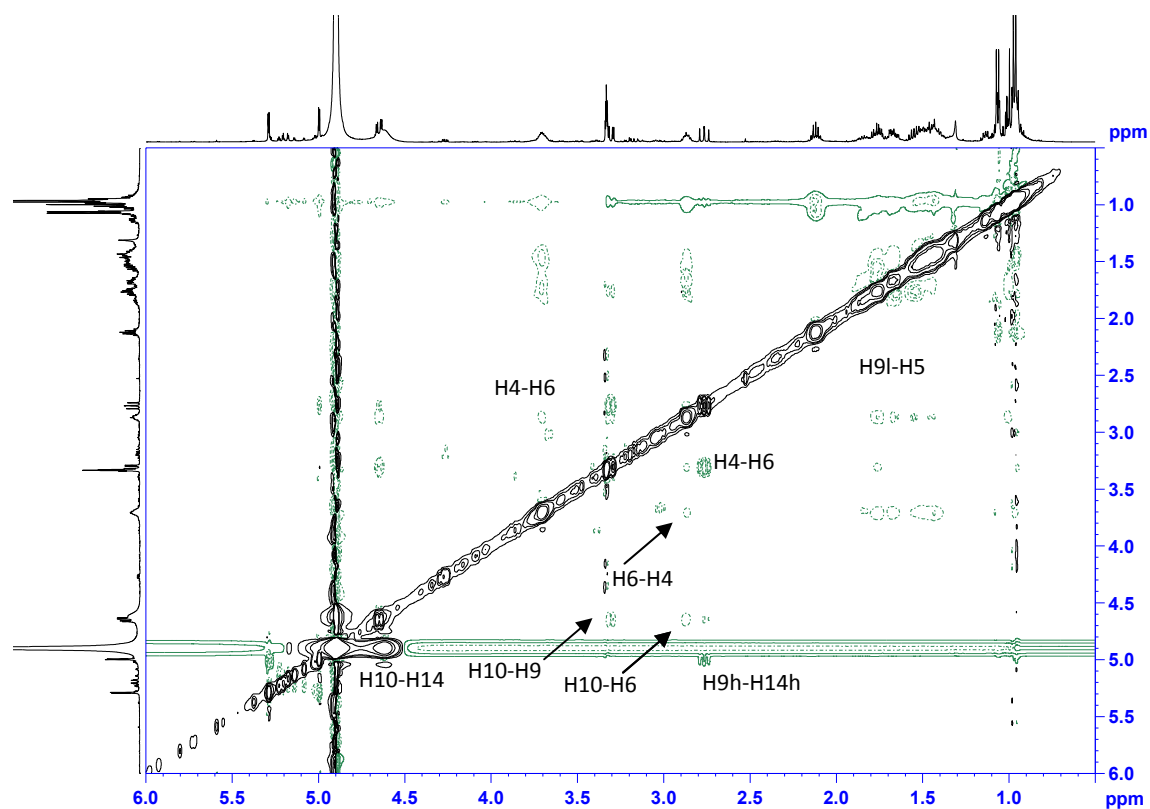


Figura 71. Espectro de ^1H - ^1H NOESY (500 MHz) de thelepipamida (**13**) con las correlaciones observadas.

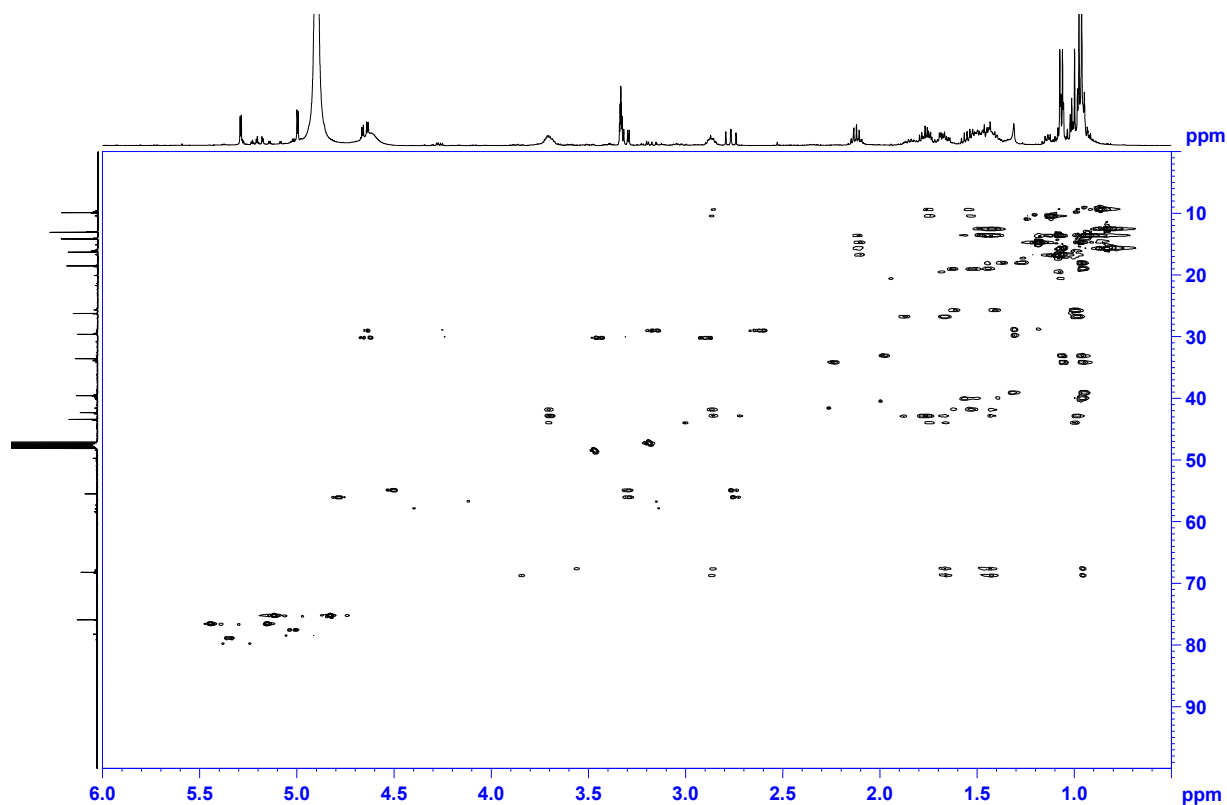


Figura 72. Experimento HSQC-HECADE de thelepipamida (**13**).

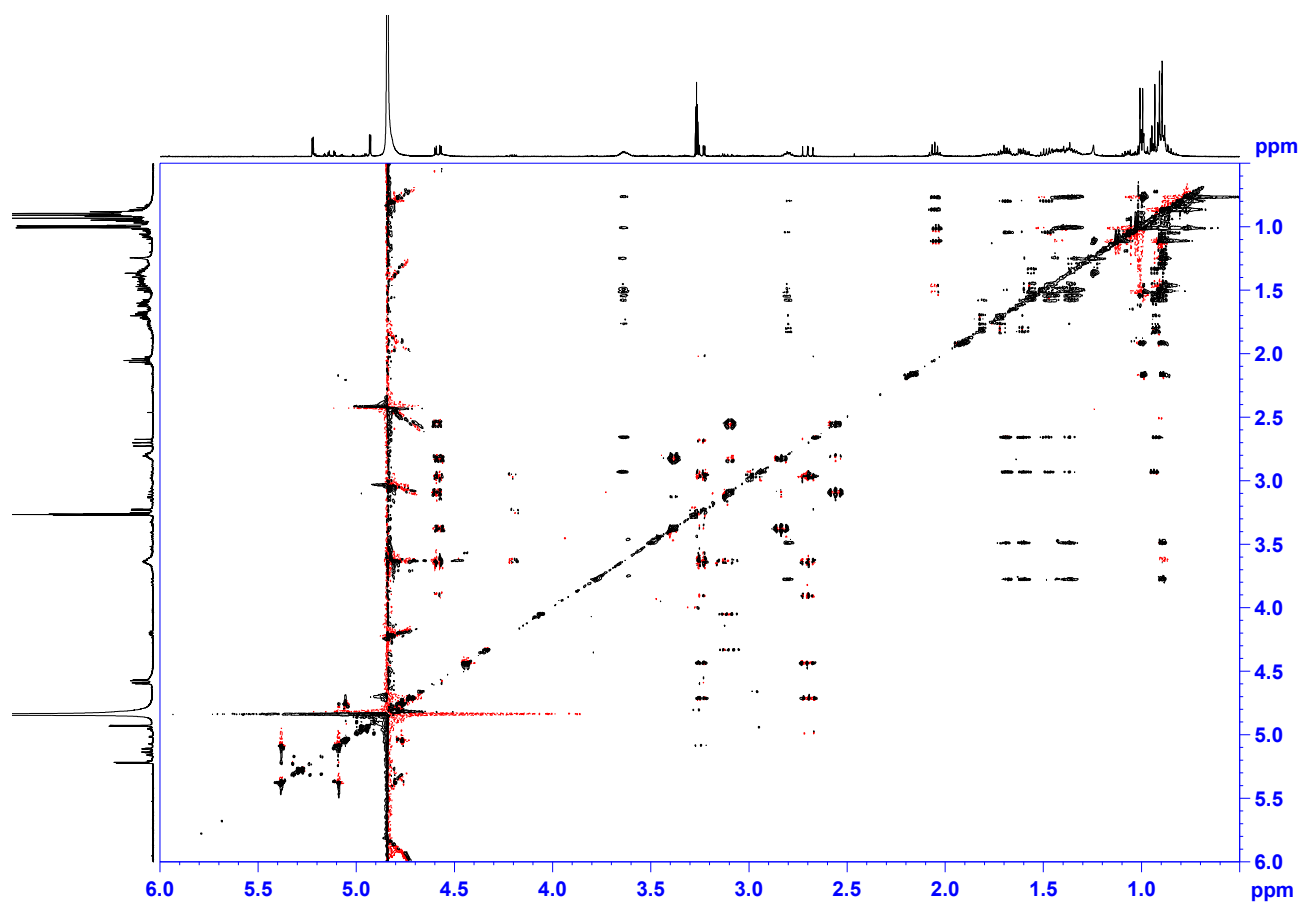


Figura 73. Experimento de HETLOC de thelepamida (13).

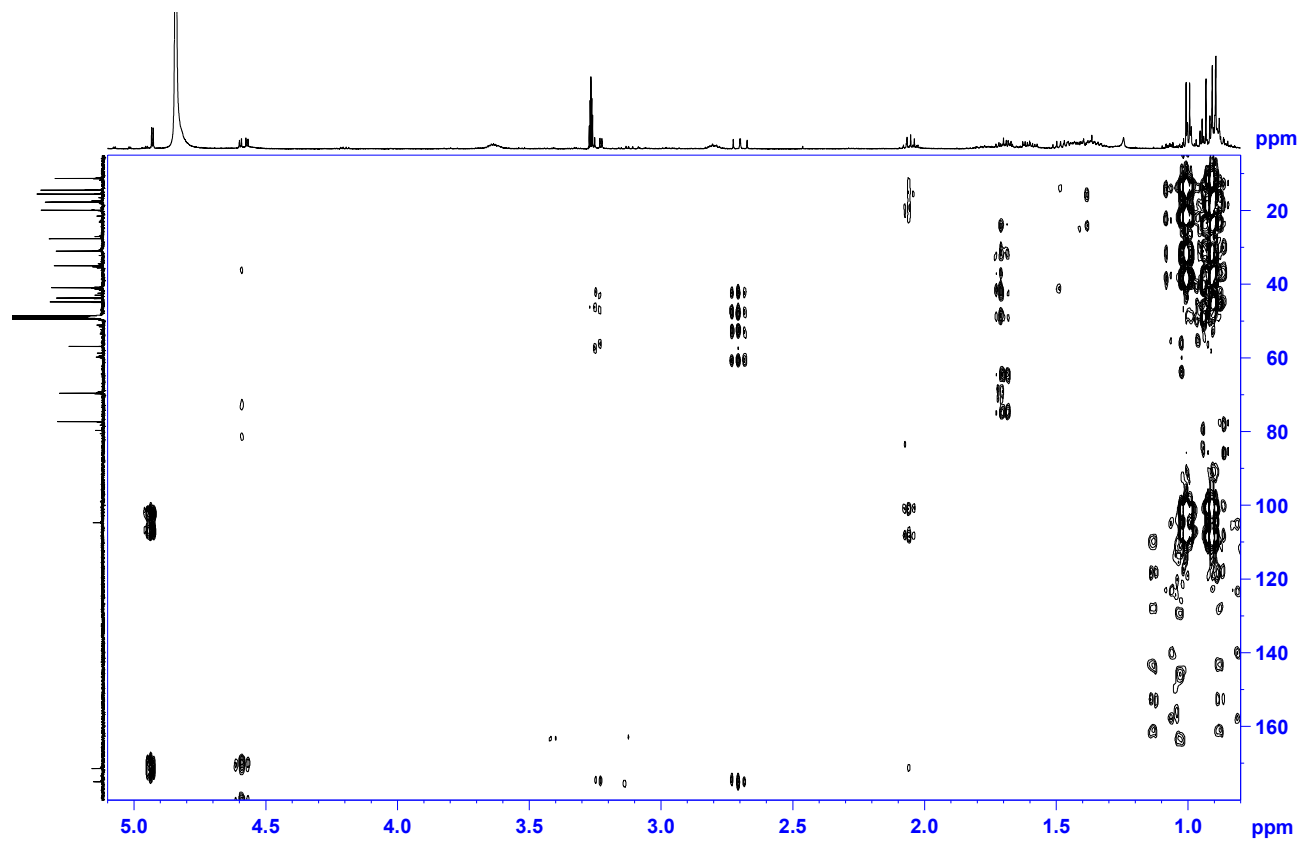
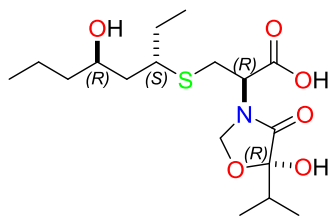
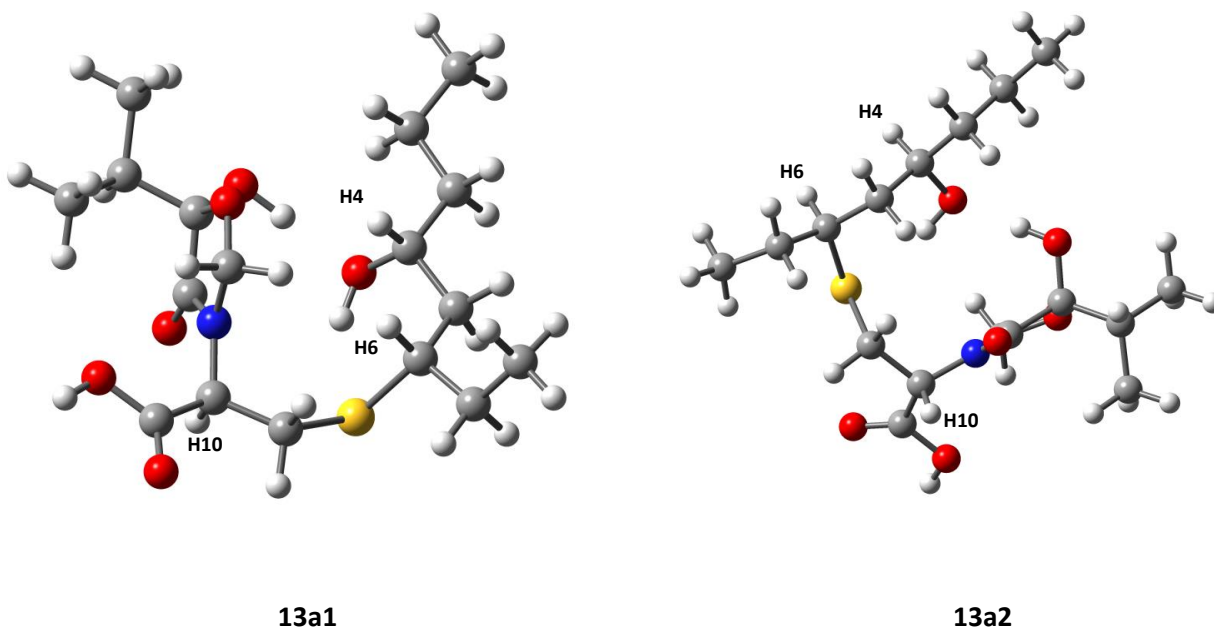


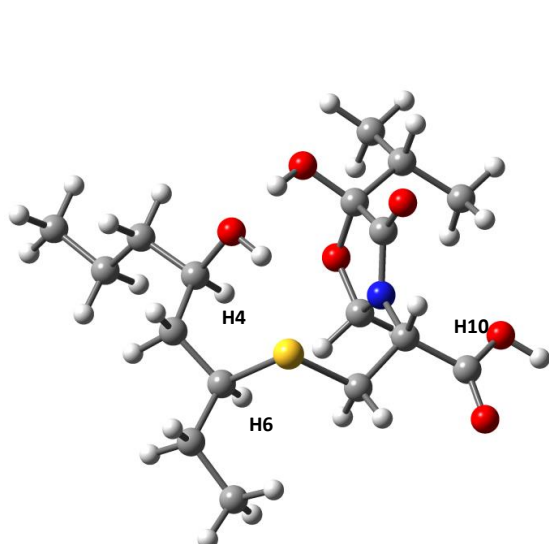
Figura 74. Experimento J-HMBC (escala 240) de thelepamida (13).


Tabla 10. Energías DFT calculadas de los conformeros encontrados mediante el estudio GMMX del diastereoisómero (*RSRR*)-**13a**.

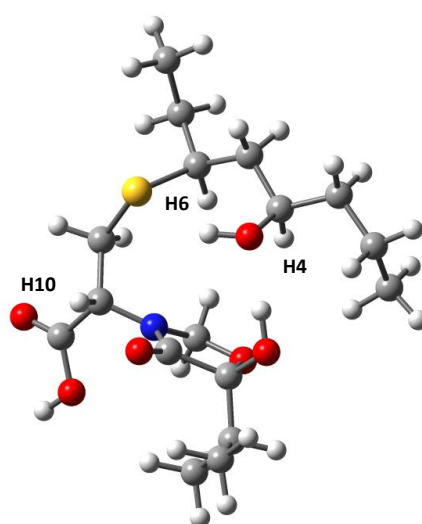
Conformeros 13a	Energía GMMX (kcal/mol)	Energía DFT (hartree)	Diferencia con mínimo DFT (kcal/mol)	% Población
13a1	0.358672	-1570.78722947	0.000000	18.08
13a2	0.484730	-1570.78700446	0.141194	14.24
13a3	1.100871	-1570.78696036	0.168867	13.59
13a4	1.513652	-1570.78673243	0.311894	10.67
13a6	1.655759	-1570.78649455	0.461165	8.29
13a11	2.073555	-1570.78640363	0.518217	7.53
13a9	1.852214	-1570.78638287	0.531244	7.37
13a8	1.852426	-1570.78631701	0.572571	6.87
13a5	1.547819	-1570.78630506	0.580070	6.78
13a13	2.332319	-1570.78572484	0.944160	3.67
13a17	2.393271	-1570.78467931	1.600233	1.21
13a15	2.351743	-1570.78421869	1.889273	0.74
13a14	2.351188	-1570.78408788	1.971357	0.65
13a16	2.392448	-1570.78326816	2.485734	0.27
13a10	1.962305	-1570.78120484	3.780473	0.03
13a7	1.665947	-1570.77996692	4.557272	0.01
13a12	2.223878	-1570.77921700	5.027849	0.00

En gris los 13 conformeros encontrados en el estudio DFT dentro de una ventana de aprox. 2.5 kcal/mol (99.6% de la población conformacional).

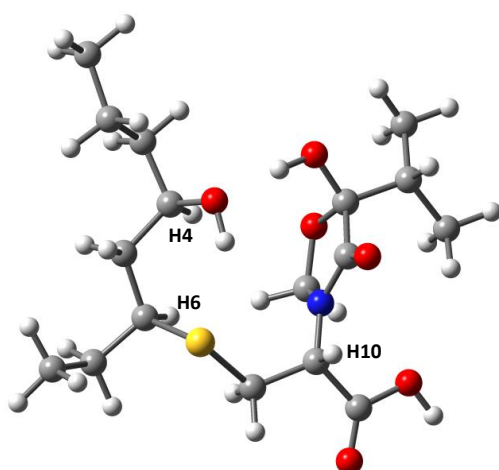

Figura 75. Estructuras de los 13 conformeros seleccionados del diastereoisómero de configuración (*RSRR*)-**13a** obtenidas en el estudio DFT.



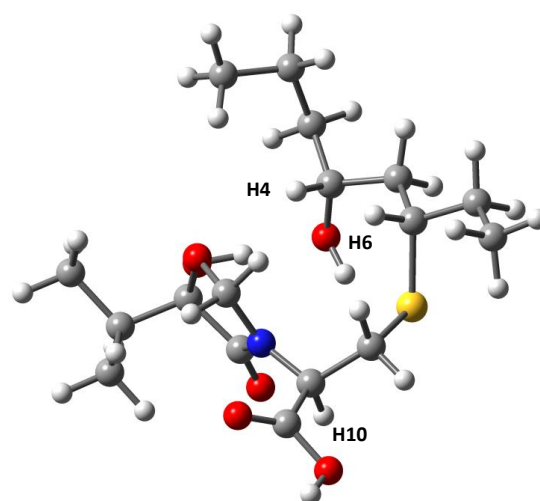
13a3



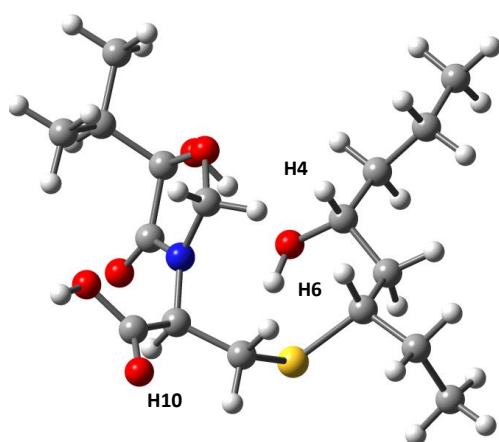
13a4



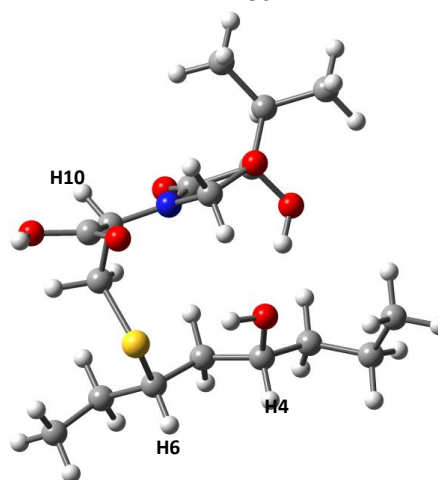
13a6



13a11

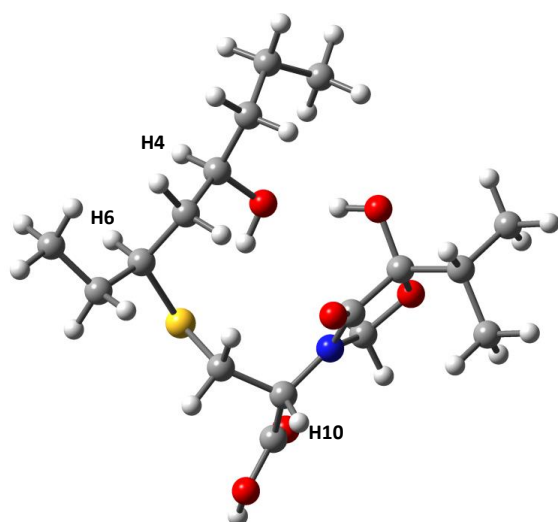


13a9

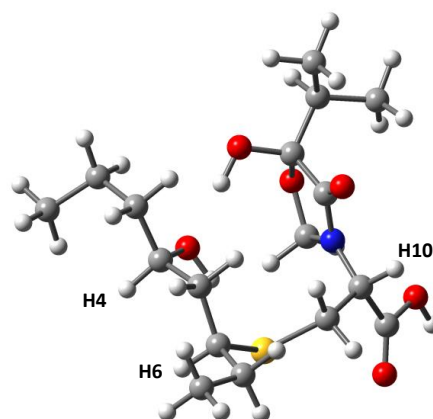


13a8

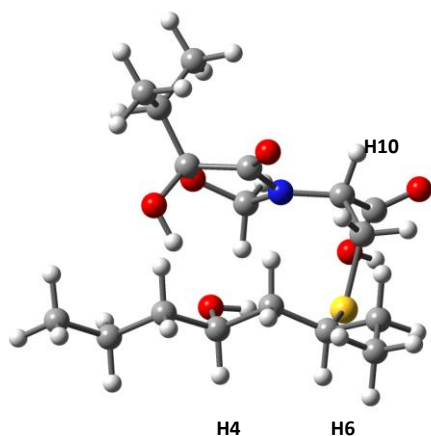
Figura 75. Continuación



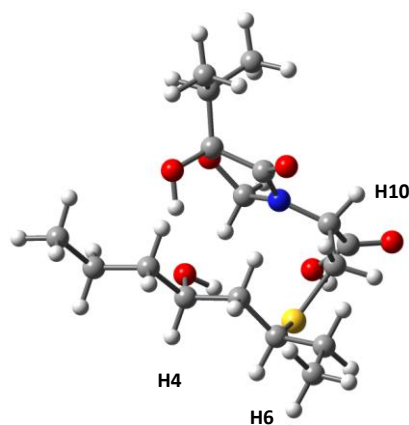
13a5



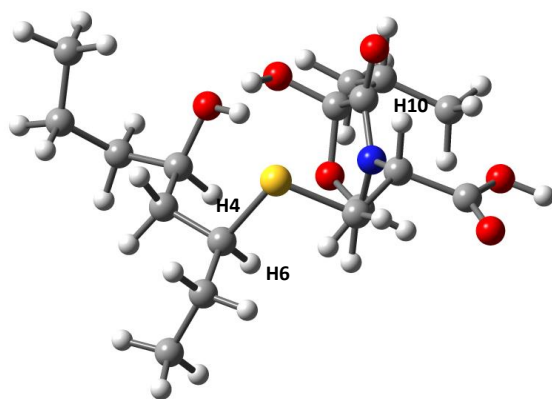
13a13



13a17



13a15



13a14

Figura 75. Continuación

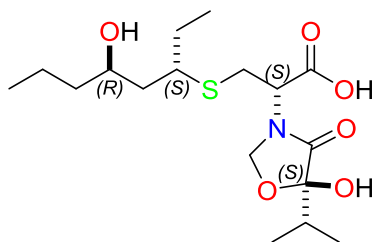
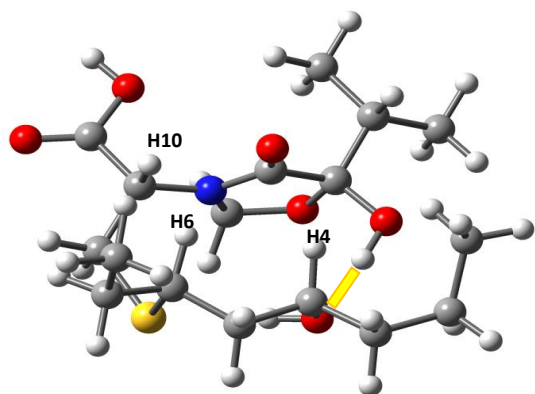


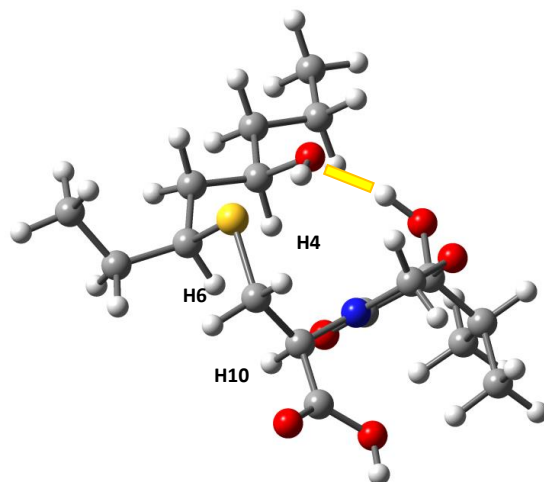
Tabla 11. Energías DFT calculadas de los conformémeros encontrados mediante el estudio GMMX del diastereoisómero (*RSSS*)-**13b**.

Confórmmero 13b	Energía GMMX (kcal/mol)	Energía DFT (hartree)	Diferencia con mínimo DFT (kcal/mol)	% Población
13b13	1.511150	-1570.79122119	0.000000	34.40
13b5	0.380968	-1570.79074095	0.301352	20.68
13b2	0.274581	-1570.79021045	0.634242	11.78
13b10	1.249890	-1570.79009063	0.709430	10.38
13b19	1.782019	-1570.79007576	0.718761	10.21
13b14	1.517903	-1570.78933072	1.186276	4.64
13b15	1.518174	-1570.78886358	1.479407	2.82
13b12	1.500341	-1570.78847549	1.722935	1.87
13b1	0.234545	-1570.78738644	2.406317	0.59
13b6	0.517970	-1570.78697817	2.662508	0.38
13b7	0.724683	-1570.78697817	2.662508	0.38
13b4	0.338387	-1570.78696395	2.671431	0.33
13b3	0.288307	-1570.78696395	2.671431	0.20
13b21	1.869769	-1570.78683936	2.749611	0.16
13b9	0.870689	-1570.78637439	3.041382	0.11
13b22	2.016382	-1570.78615443	3.179407	0.11
13b18	1.627282	-1570.78582530	3.385937	0.06
13b11	1.407622	-1570.78582455	3.386408	0.06
13b20	1.783337	-1570.78530442	3.712791	0.02
13b8	0.786328	-1570.78523655	3.755380	0.02
13b17	1.624797	-1570.78428497	4.352499	0.01
13b16	1.540172	-1570.78406750	4.488962	0.00
13b23	2.095243	-1570.78405168	4.498889	0.00
13b24	2.209416	-1570.78376999	4.675650	0.00

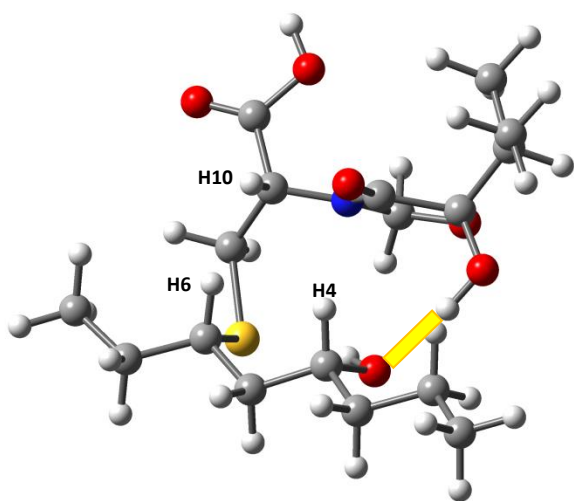
En gris los 8 conformémeros encontrados en el estudio DFT dentro de una ventana de 2.5 kcal/mol (96.5% de la población conformacional).



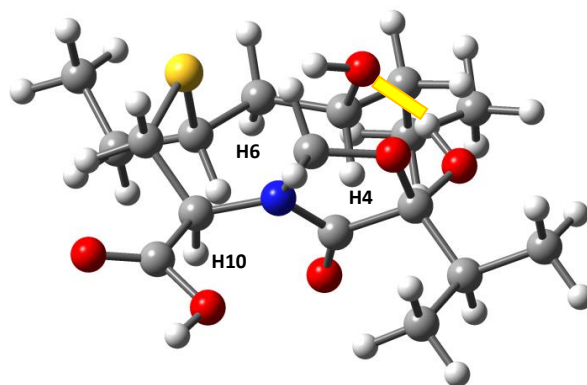
13b13



13b5

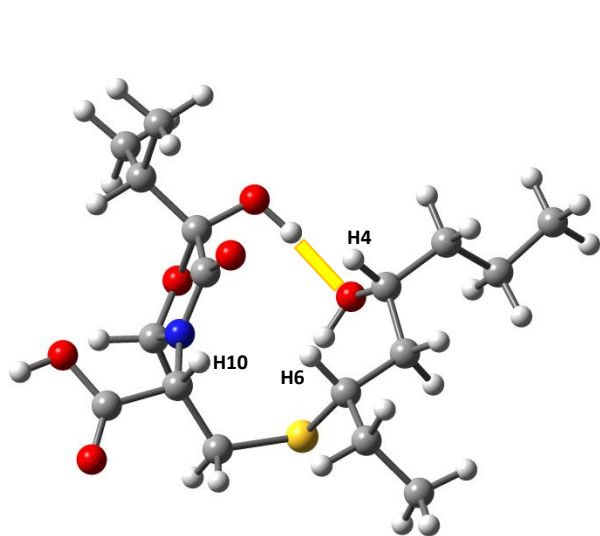


13b2

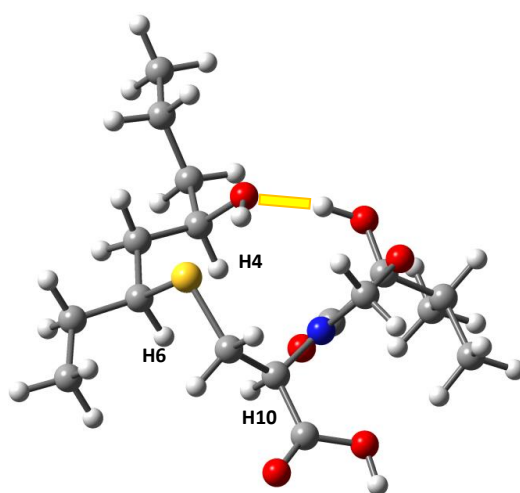


13b10

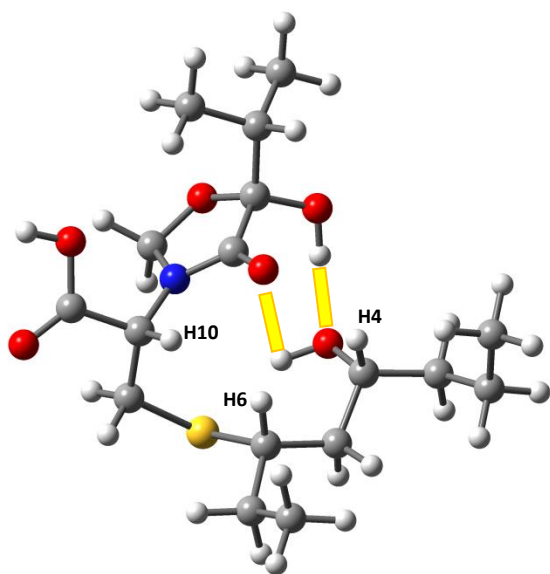
Figura 76. Estructuras de los 8 conformeros seleccionados del diastereoisómero de configuración (*RSSS*)-**13b** obtenidas en el estudio DFT. Se indica en amarillo enlace de hidrógeno.



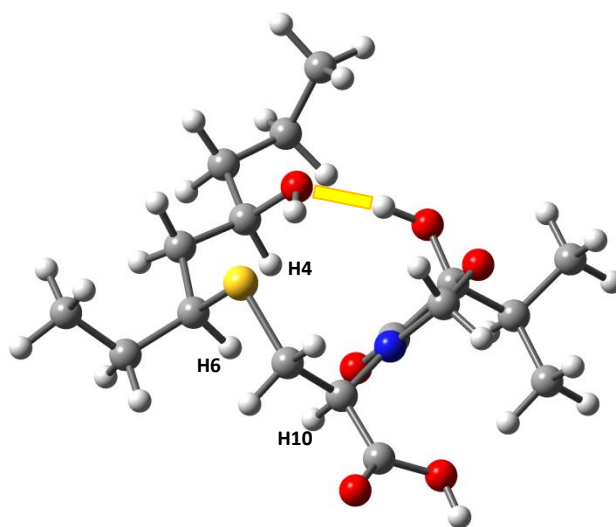
13b19



13b14



13b15



13b12

Figura 76. Continuación.

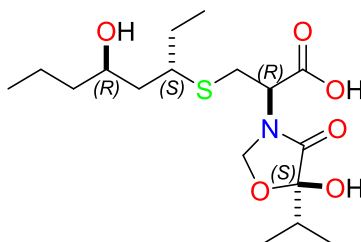


Tabla 12. Energías DFT calculadas de los conformeros encontrados mediante el estudio GMMX del diastereoisómero (*RSRS*)-**13c**.

Confórmero 13c	Energía GMMX (kcal/mol)	Energía DFT (hartree)	Diferencia con mínimo DFT (kcal/mol)	% Población
13c4	0.366856	-1570.78844197	0.000000	29.42
13c2	0.235352	-1570.78841181	0.018925	28.49
13c3	0.302827	-1570.78802666	0.260608	18.94
13c1	-0.259756	-1570.78776388	0.425504	14.33
13c10	1.449502	-1570.78707627	0.856981	6.91
13c6	0.857949	-1570.78693375	0.946413	1.03
13c11	1.449665	-1570.78528004	1.984121	0.55
13c5	0.692156	-1570.78469433	2.351655	0.18
13c8	1.207963	-1570.78364188	3.012071	0.05
13c9	1.442019	-1570.78291253	3.469740	0.00
13c7	1.160226	-1570.78237100	3.809552	0.00

En gris los 8 conformeros encontrados en el estudio DFT dentro de una ventana de 2.5 kcal/mol (98.2% de la población conformacional).

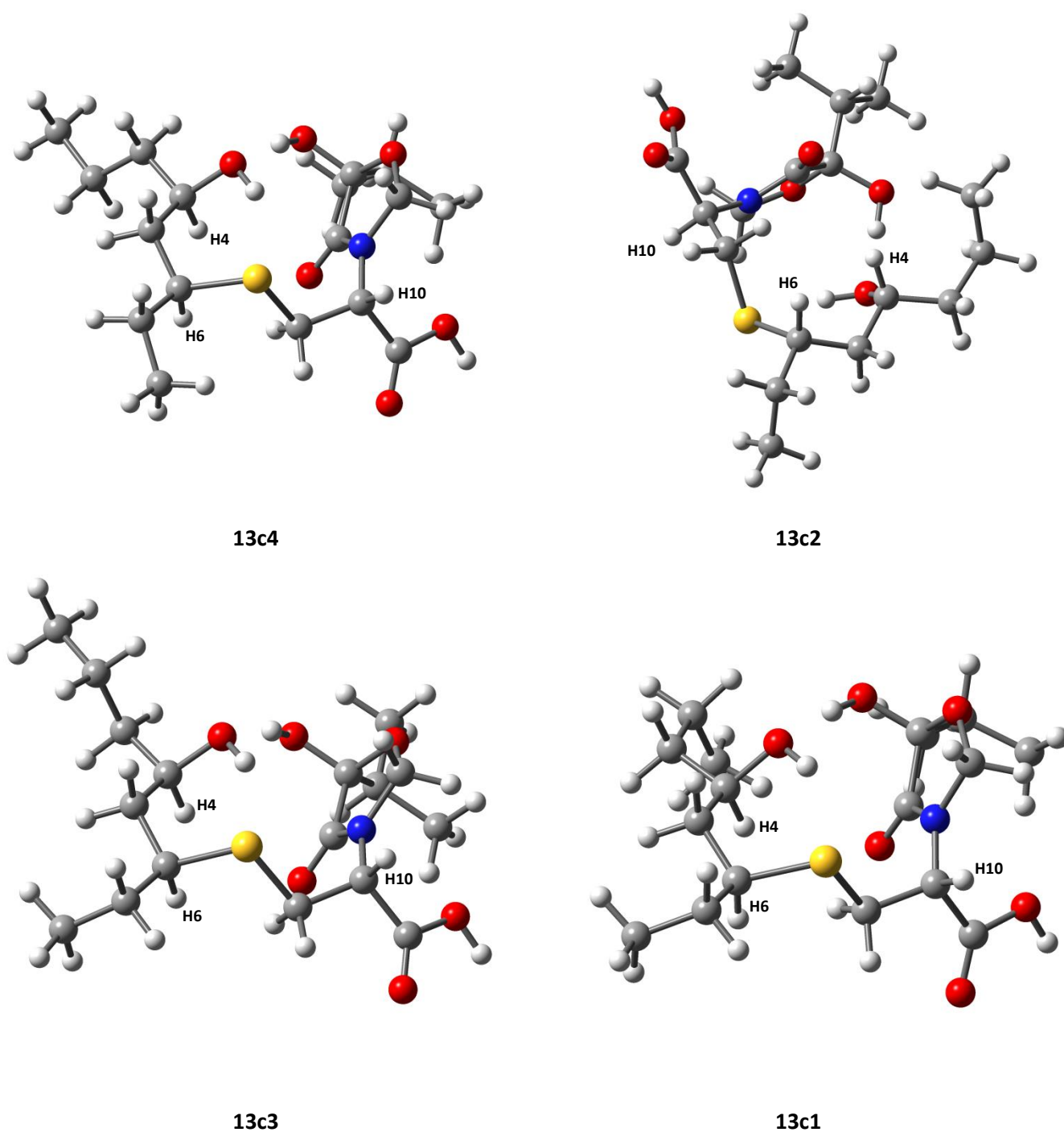


Figura 77. Estructuras de los 8 conformeros seleccionados del diastereoisómero de configuración (*RSRS*)-**13c** obtenidas en el estudio DFT.

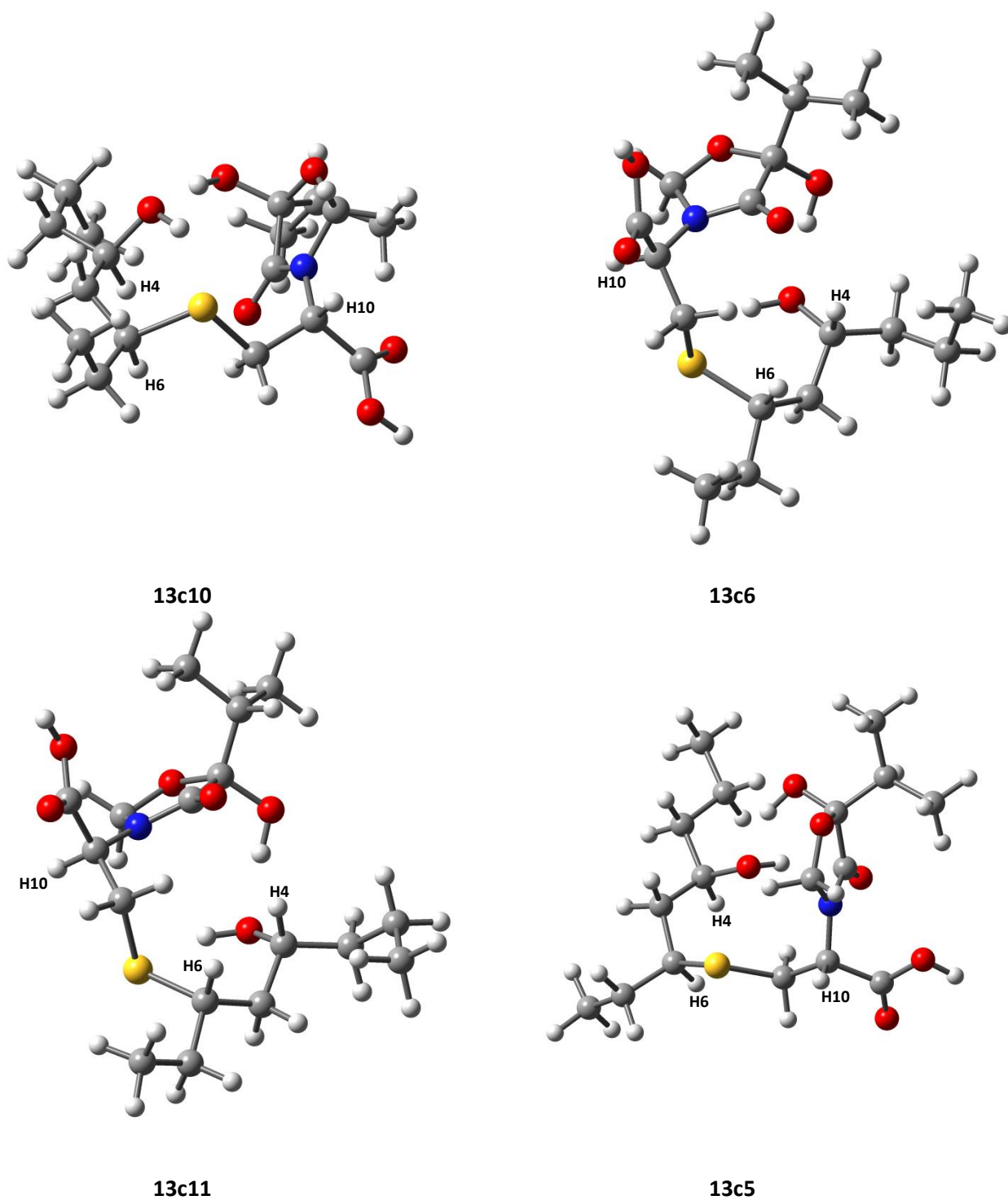
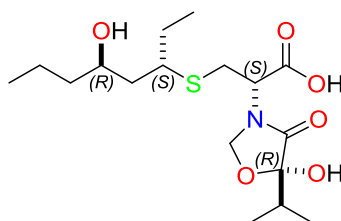
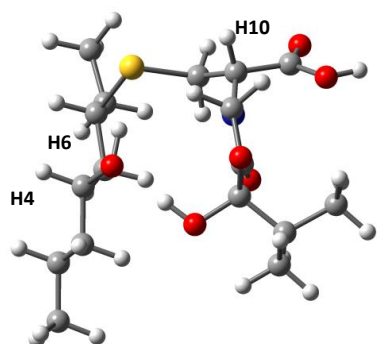
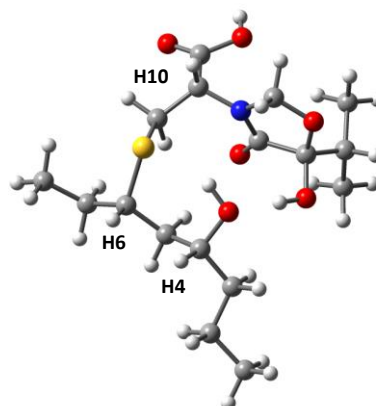
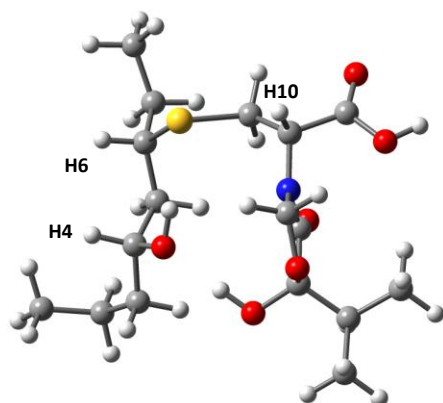


Figura 77. Continuación


Tabla 13. Energías DFT calculadas de los conformeros encontrados mediante el estudio GMMX para el diastereoisómero (*RSSR*)-**13d**.

Conformero 13d	Energía GMMX (kcal/mol)	Energía DFT (hartree)	Diferencia con mínimo DFT (kcal/mol)	% Población
13d1	-1.325880	-1570.79148400	0.000000	84.90
13d2	0.289073	-1570.78954057	1.219508	10.81
13d3	0.539567	-1570.78866809	1.766992	4.29
13d4	0.609959	-1570.78164406	6.174592	0.00

En gris los 3 conformeros encontrados en el estudio DFT dentro de una ventana de 2.5 kcal/mol (100 % de la población conformacional).¹¹⁹


13d1

13d2

13d3
Figura 78. Estructuras de los 3 conformeros seleccionados del diastereoisómero de configuración (*RSSR*)-**13d** obtenidas en el estudio DFT.

A partir de los datos anteriormente expuestos, la estructura relativa final propuesta para thelepamida (**13**) es la de ácido (*S*^{*})-2-((*S*^{*})-5-hidroxi-5-isopropil-4-oxooxazolidin-3-il)-3-(((3*S*^{*},5*R*^{*})-5-hidroxiocetan-3-il)tio) propanoico.

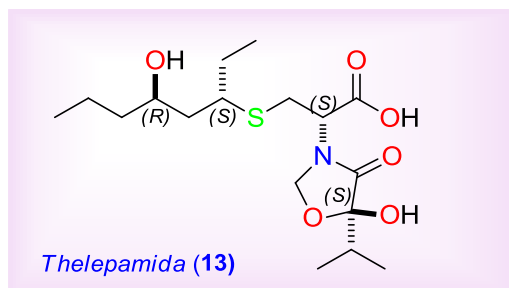


Tabla 14. Datos RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) del compuesto **13** (*l* señal a más frecuencia y *h* señal a menos frecuencia).

Posición	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm) mult.
1	0.94 t 6.5	14.5 c
2	1.46 m	19.9 t
	1.36 m	
3	1.38 m	40.9 t
	1.36 m	
4	3.65 m	69.5 d
5	<i>l</i> 1.77 m	43.6 t
	<i>h</i> 1.60 m	
6	2.86 m	44.7 d
7	1.69 m	27.5 t
	1.47 m	
8	0.89 t 6.4	11.2 c
9	<i>l</i> 3.28 dd 3.5, 13.0	30.9 t
	<i>h</i> 2.70 t 13.0, 13.0	
10	4.69 dd 13.0, 3.5	56.8 d
11		174.3 s
12		171.4 s
13		104.7 s
14	<i>l</i> 5.26 d 2.5	77.3 t
	<i>h</i> 4.94 d 2.5	
15	2.18 sept 6.6	34.9 d
16	0.98 d 6.6	17.7 c
17	1.10 d 6.6	15.5 c

No existen precedentes de ningún producto natural que contenga un anillo oxazolidinona con los sustituyentes presentes en thelepamida (**13**). La búsqueda bibliográfica en la base de datos Scifinder nos condujo únicamente a dos publicaciones que describen la síntesis, por diferentes métodos, de las oxazolidinonas 5-fenil-5-hidroxi-3-metiloxazolidin-4-ona³⁵⁸ y 3-bencil-5-hidroxi-5-metiloxazolidin-4-ona,³⁵⁹ cuyas estructuras se muestran en la Figura 79.

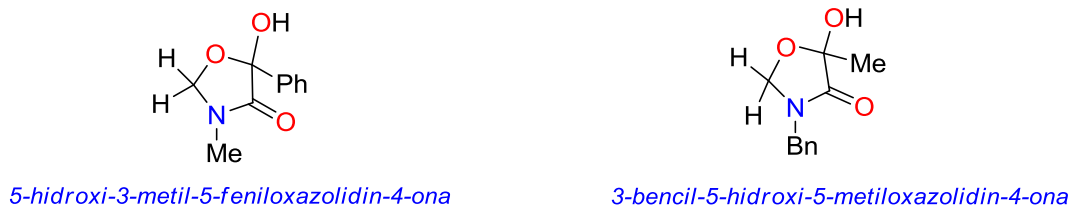


Figura 79. Estructuras de las oxazolidinonas sintéticas que poseen un anillo similar al existente en thelepamida (**13**).

Los datos espectroscópicos de RMN ¹H (Tabla 15) y ¹³C (Tabla 16) publicados para esos compuestos resultaron ser prácticamente idénticos con los correspondientes al anillo de oxazolidinona presente en thelepamida (**13**), lo que sería una prueba adicional de la presencia de dicho anillo en la estructura propuesta.

Tabla 15. Comparación entre los desplazamientos químicos de RMN ¹H de las oxazolidinonas sintéticas y los de thelepamida (**13**).

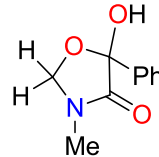
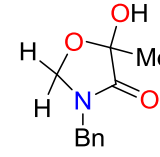
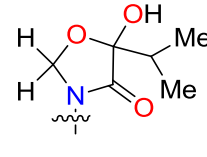
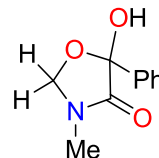
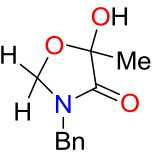
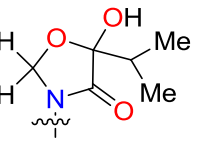
 δ_H	 δ_H	 δ_H (13)
5.00 (1H d, <i>J</i> = 3.3 Hz, CH ₂)	5.05 (1H d, <i>J</i> = 3.2 Hz, CH ₂)	4.94 (1H d, <i>J</i> = 2.5 Hz, CH ₂)
4.75 (1H d, <i>J</i> = 3.3 Hz, CH ₂)	5.20 (1H d, <i>J</i> = 3.2 Hz, CH ₂)	5.26 (1H d, <i>J</i> = 2.5 Hz, CH ₂)

Tabla 16. Comparación entre los desplazamientos químicos de RMN ¹³C de las oxazolidinonas sintéticas y los de thelepamida (**13**).

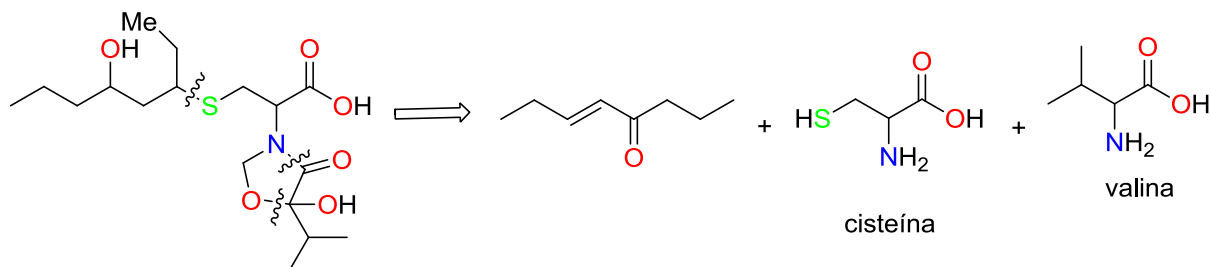
 δ_C	 δ_C	 δ_C (13)
169.5 (C=O)	167.7 (C=O)	171.4 (C=O)
99.6 (C-5)	99.5 (C-5)	104.7 (C-13)
77.1 (C-2, CH ₂)	79.3 (C-2, CH ₂)	77.3 (C-2, CH ₂)

³⁵⁸ Wang R., Chen, C., Duesler E., Mariano P. S. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 1215.

³⁵⁹ Haque A., Ishikawa H., Nishino H. *Chem. Lett.* **2011**, 40, 1349.

I.2.3.2.6 Ruta biogenética

Teniendo en cuenta la estructura de thelepamida (**13**) se propone como posibles precursores de su biosíntesis un policétido (una cetona α,β -insaturada) y los aminoácidos cisteína y valina.



I.2.3.2.7 Actividad antitumoral de thelepamida (**13**)

Los resultados del estudio de la citotoxicidad de thelepamida (**13**) mostraron que es moderadamente activo con un IC_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$ y selectivo frente a células tumorales CCRF-CFM (leucemia), ya que no presentó actividad frente a las células MCF-7 (carcinoma de colon) y HCT-116 (carcinoma de mama) (IC_{50} mayor de 5 $\mu\text{g/mL}$).

I.3 Conclusiones del capítulo I

1. Como resultado del estudio químico del coral blando *Briareum* sp., recolectado en las Islas Togian, Sulawesi (Indonesia), se han aislado de la fracción de diclorometano **FD** diez diterpenos, compuestos **1-10**, que poseen esqueleto de briarano. Los compuestos 13-deshidroxiestechólido J (**1**), 2,9-diacetil-2-desbutirilestechólido H (**2**) y acetato de 2 β -acetoxi-2-(desbutiriloxy)estechólido E (**3**) resultaron ser nuevos productos naturales los cuales han sido caracterizados utilizando fundamentalmente técnicas espectroscópicas de RMN y espectrometría de masas. Los compuestos estechólido I (**4**), estechólido J (**5**), estechólido K (**6**), estechólido L (**7**), estechólido M (**8**), acetato de estechólido A (**9**), acetato de estechólido C (**10**) ya habían sido descritos anteriormente.
2. Los compuestos **1-3** no presentaron actividad citotóxica frente a células tumorales P-388, A-549, HT-29 y MEL-28 a concentraciones menores de 10 $\mu\text{g/ml}$, aunque **3** se ha mencionado en la bibliografía que posee citotoxicidad contra células P-388 (leucemia de ratón) con un valor de EC_{50} de 1.59 $\mu\text{g/mL}$. La evaluación citotóxica de los compuestos de **4-7**, **9** y **10** mostró que estechólido L (**7**) posee una moderada actividad citotóxica frente a las células tumorales P-388 (IC_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$), A-549 (IC_{50} de 2.5 $\mu\text{g/mL}$), HT-29 (IC_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$) y MEL-28 (IC_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$), mientras que los compuestos de **4-6**, **9** y **10** no mostraron actividad citotóxica frente a esas células tumorales a concentraciones menores de 10 $\mu\text{g/mL}$.
3. El estudio realizado a la esponja *Dysidea* sp. recolectada en la Isla de Mayo (Indonesia) ha dado lugar al aislamiento, de los dipéptidos policlorinados **11** y **12** de la fracción de diclorometano **FD**. El compuesto **11**, denominado como dysitiazolamida, resultó ser un nuevo producto natural cuya estructura fue deducida mediante un profundo análisis de sus datos espectroscópicos de RMN y de espectrometría de masas, mientras que el compuesto **12** fue identificado como dysidenina y ya había sido descrito anteriormente en la bibliografía.
4. Los análisis farmacológicos de los compuestos **11** y **12** no mostraron actividad citotóxica a valores menores de 10 $\mu\text{g/mL}$ frente a las células tumorales P-388 (linfoma de ratón), A-549 (carcinoma de pulmón humano), HT-29 (carcinoma de colon) y MEL-28 (melanoma humano).
5. Como resultado del estudio químico del anélido poliqueto *Thelepus crispus* recolectado en Friday Harbor (Washington, EEUU) se ha aislado, un nuevo producto natural al que se nombró thelepamida (**13**) de la fracción metanólica-acuosa, **FM**. Su estructura plana se determinó mediante métodos espectroscópicos de RMN y espectrometría de masas, mientras que su estereoquímica relativa se propuso mediante la aplicación de método de Murata y un profundo estudio de modelización molecular utilizando métodos DFT. La estructura propuesta para thelepamida (**13**) como el ácido (S*)-2-((S*)-5-hidroxi-5-isopropil-4-oxooxazolidin-3-il)-3-(((3S*,5R*)-5-hidroxiocetan-3-il)tio)propanoico contiene un anillo de oxazolidinona que no posee precedente alguno en la química de productos naturales.
6. Los ensayos de citotoxicidad mostraron que thelepamida (**13**) presenta una moderada y actividad selectiva citotóxica con un IC_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$ frente a células tumorales CCRF-CFM (leucemia).



CAPÍTULO II

Estudio de
acuicultura de la
esponja *Acanthella*
cavernosa

II.1 Objetivos

El objetivo principal del segundo capítulo de la presente tesis doctoral es evaluar la producción de una serie de compuestos producidos por esponjas del género *Acanthella cavernosa* cultivadas en cautividad en un entorno controlado de acuicultura que fueron inicialmente recolectadas en las Islas de la República de Fiyi Oceanía durante el año 1992.

Para ello se trazó el siguiente plan de trabajo:

1. Estudio de los productos naturales de interés producidos por las esponjas *Acanthella cavernosa* directamente recolectadas de su hábitat natural, que sirva de referencia para poder compararlo cuando se cultive en el entorno controlado de acuicultura.

1.1 Extracción de los organismos siguiendo un esquema de fraccionamiento combinando disolventes de diferentes polaridades.

1.2 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios de interés, mediante la utilización de diversas técnicas cromatográficas: columnas de gel de sílice, Sephadex LH20 y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

1.3 Identificación estructural de los metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de protón monodimensionales (^1H) y carbono trece (^{13}C) y bidimensionales COSY, NOESY, HMQC y HMBC; espectrometría de masas de impacto electrónico (EI), bombardeo de átomos acelerados (FAB) y espectrospray (ES), así como difracción de Rayos X para aquellos compuestos de los que se obtuvieron cristales aptos para su análisis.

1.4 Desarrollo de un método analítico para la determinación cuantitativa de los compuestos aislados a partir de especímenes individuales

2. Estudio de la variación de la producción de los compuestos identificados previamente en los especímenes individuales de la esponja *A. cavernosa* que fueron cultivados en cautividad en un entorno controlado y a diferentes condiciones de crecimiento.

2.1 Extracción y fraccionamiento de cada espécimen de la esponja *A. cavernosa* cultivada en el sistema de acuicultura, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el estudio anterior.

2.2 Estudio químico analítico cuantitativo por HPLC de las fracciones obtenidas de cada espécimen *Acanthella cavernosa*.

2.3 Valoración sobre si el método de acuicultura diseñado supone una optimización en la producción de los metabolitos de interés.

II.2. Antecedentes bibliográficos

El filo Porifera ha sido estudiado extensivamente por los químicos de productos naturales encontrándose estructuras únicas de metabolitos bioactivos.³⁶⁰ Más concretamente estudios químicos de esponjas del género *Acanthella* han mostrado la presencia de terpenos con estructuras tricíclicas con la presencia de sustituyentes isociano, isotiociano, ciano, tiociano y dicloroimino.^{361,362} Estos terpenos han demostrado ser potentes agentes antibacterianos, citotóxicos, antimaláricos y con actividad antiincrustante.³⁶³ Un dato sorprendente es la incorporación del grupo ciano en estos metabolitos marinos,³⁶⁴ dado el carácter tóxico de dicho grupo para muchas formas de vida.^{365,366,367} De *Acanthella cavernosa* se ha aislado un grupo numeroso de terpenoides tricíclicos a los que se les ha denominado kalihinoles siendo muchos de ellos característicos del género *Acanthella*.³⁶⁴

En la Figura 80 y en la Figura 81^{368,369} se muestran algunos ejemplos de los kalihinoles más recientes que han sido aislados de *A. cavernosa*. Algunos de ellos como los kalihinenos M-T mostraron potente actividad antiincrustante y moderadas actividades citotóxicas frente a las células tumorales H-1299, A-549, PC3, CT-26 y HCT-116.

³⁶⁰ Faulkner D. J. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1.

³⁶¹ a) Chang C. W. J., Scheuer P. J. *Top. Curr. Chem.* **1993**, *167*, 34. b) Garson, M. J., Simpson, J. S., Flowers, A. E., Dumdei, E. J. *Stud. Nat. Prod.* **2000**, *21*, 329.

³⁶² a) Hirota H., Okino T., Yoshimura E., Fusetani N. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13971. b) Li C.-J., Schmitz F. J., Kelly M. J. *Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1330. c) Tanaka J., Higa T. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1339. d) Ciavatta M. L., Fontana A., Puliti R., Scognamiglio G., Cimino G. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12629.

³⁶³ a) Schmitz F. J., Bowden B. F., Toth S. I. Marine biotechnology. In *Marine Biotechnology: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, Attaway D. H., Zaborsky O. R. Eds., Plenum: New York, **1993**, *1*, pp 197±308. b) Fusetani N. *Curr. Org. Chem.* **1997**, *1*, 127. c) Wright A. D., Koënic G. M., Angerhofer C. K., Greenidge P., Linden A., Desqueyroux-Faundez R. J. *Nat. Prod.* **1996**, *59*, 710.

³⁶⁴ a) Garson M. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, *35*. b) Fookes C. J. R., Garson M. J., MacLeod J. K., Skelton B. W., White, A. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 1003. c) Karuso P., Scheuer P. J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2092. d) Dumdei E. J., Fowers A. E., Garson M. J., Moore C. J. *Comp. Biochem. Physiol. A* **1997**, *118*, 1385.

³⁶⁵ Vennesland B., Conn E. E., Knowles C. J., Westley J., Wissing F. Eds. *Cyanide in Biology*, Academic Press: London, **1981**.

³⁶⁶ Sesquiterpenos: a) Minale L., Riccio R., Sodano G. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1341. b) Ciminiello P., Magno S., Mayol, L., Piccialli, V. J. *Nat. Prod.* **1987**, *50*, 217. c) Mayol L., Piccialli V., Sica D. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5381. d) Braekman J. C., Daloze D., Deneubourg F., Hysecom J., Vandevyer G. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1987**, *96*, 539. e) Capon R. J., MacLeod J. K. *Aust. J. Chem.* **1988**, *41*, 979. f) Braekman J. C., Daloze D., Moussiaux B., Stoller C., Deneubourg F. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 509. g) Alvi K. A., Tenenbaum L., Crews P. J. *Nat. Prod.* **1991**, *54*, 71. h) Fusetani N., Wolstenholme H. J., Shinoda K., Asai N., Matsunaga S., Onuki H., Hirota H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6823. i) Koënic G. M., Wright A. D., Sticher O., Fronczek F. R. J. *Nat. Prod.* **1992**, *55*, 633. j) Angerhofer C. D., Pezzuto J. M., Koënic G. M., Wright A. D., Sticher O. J. *Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1787. k) Dumdei E. J., Andersen R. J. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4563. l) Hirota H., Tomono Y., Fusetani N. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2359.

³⁶⁷ Diterpenos: a) Chang C. W. J., Patra A., Roll D. M., Scheuer P. J., Matsumoto G. K., Clardy J. J. *Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4644. b) Patra A., Chang C. W. J., Scheuer, P. J., Van Duyne, G. D., Matsumoto, G. K., Clardy, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7981. c) Chang C. W. J., Patra A., Baker J. A., Scheuer P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6119. d) Omar S., Albert C., Fanni T., Crews P. J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5971. e) Fusetani N., Yasumuro K., Kawai H., Natori T., Brinen L., Clardy J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3599. f) Rodriguez J., Nieto, R. M., Hunter L. M., Diaz M. C., Crews P., Lobkovsky E., Clardy, J. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11079. g) Trimurtulu, G. Faulkner D. J. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 501. h) Braekman J.-C., Daloze D., Gregoire F., Popov S., Van Soest R. *Bull. Chim. Soc. Belg.* **1994**, *103*, 187. i) Okino T., Yoshimura E., Hirota H., Fusetani N. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8637. j) Okino T., Yoshimura E., Hirota, H., Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1081. l) Wolf D., Schmitz F. J. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1524. m) Miyaoko H., Shimomura M., Kimura H., Yamada Y., Kim H.-S., Wataya Y. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13 467.

³⁶⁸ Xu Y., Li N., Jiao H., Wang P., Peng Y., Qi S., Song S., Chen W., Lin H. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2876.

³⁶⁹ Xu Y., Lang J. H., Jiao W. H., Wang R. P., Peng Y., Song S. J., Zhang B. H., Lin H. W. *Mar. Drugs* **2012**, *7*, 1445.

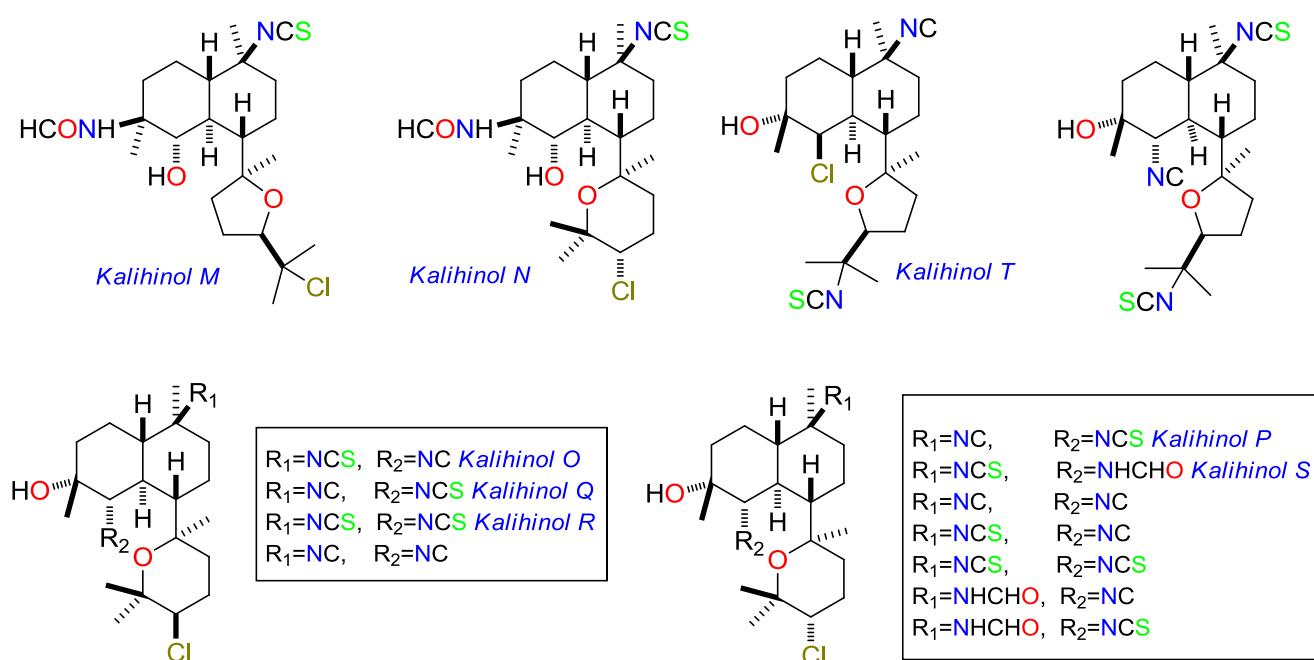


Figura 80. Estructuras de kalihinoles M, N, O, P, Q, R, S T aislados de *Acanthella cavernosa*.

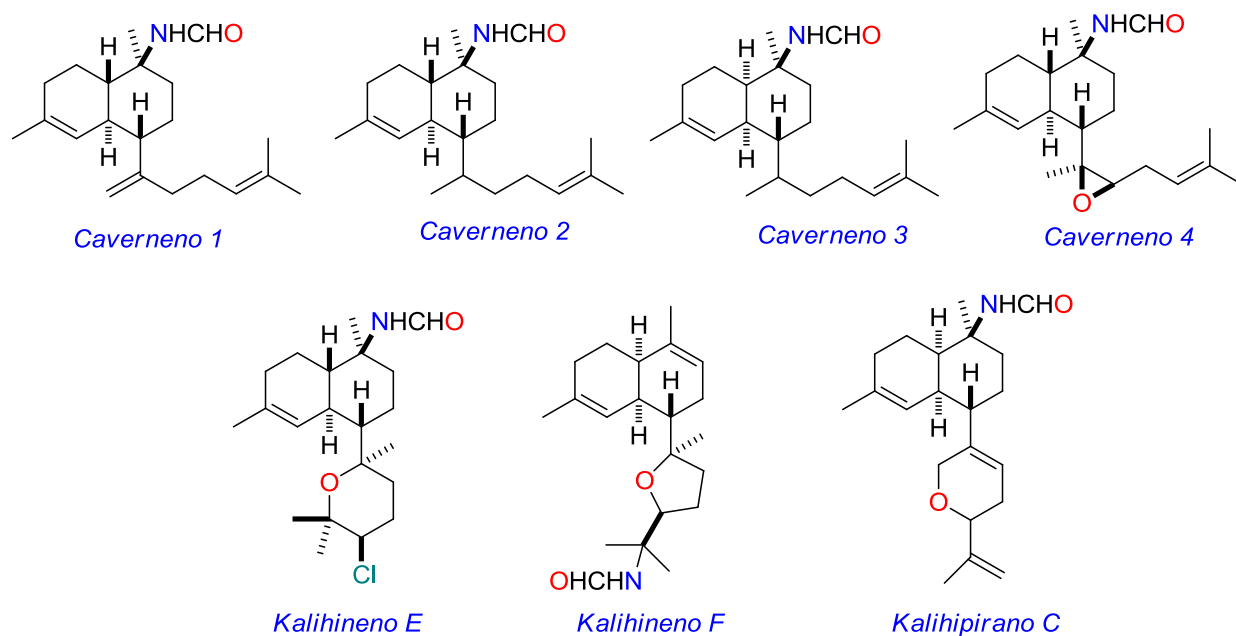


Figura 81. Estructuras de nuevos derivados de kalihinoles aislados de *A. cavernosa*.

Se han descrito las síntesis de algunos de ellos,³⁷⁰ entre las que cabe destacar la del kalihinol A (Figura 82) dada la potente actividad antimalárica que posee.

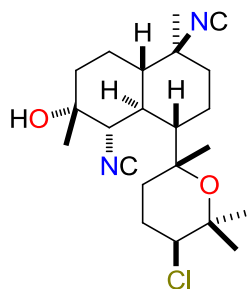


Figura 82. Estructura de kalihinol A.

II.2.1 Acuicultura en organismos marinos

Un problema fundamental para el desarrollo de fármacos a partir de fuentes naturales marinas es el de su suministro. Desarrollar un fármaco de origen natural marino a partir de su extracción del organismo recolectado en su medio natural, es inviable por razones tanto ecológicas como económicas. Esto es debido a la baja proporción en la que se encuentra, ya que la relación metabolito secundario frente al peso húmedo de organismo es aproximadamente 10^{-4} - 10^{-6} e incluso a veces menor.³⁷¹ Esto significa que sería necesario recolectar grandes cantidades de biomasa en su medio natural, transportarlas, extraerlas y purificarlas en pequeños lotes para lograr obtener la cantidad suficiente de compuesto para realizar los ensayos preclínicos necesarios para su desarrollo inicial como fármaco. Por otra parte, aunque los compuestos naturales puedan ser obtenidos a través de una síntesis factible tanto desde el punto de vista químico como económico, es importante desarrollar una tecnología complementaria de suministro. Todo esto implica encontrar fuentes alternativas renovables cuyo coste económico sea viable.

A partir de la mitad de los años 80 la acuicultura comercial, tanto de organismos procedentes de agua salada como de agua dulce, tuvo un gran desarrollo a nivel mundial. La pregunta obvia para la industria farmacéutica era si se podrían utilizar esos mismos métodos de acuicultura para el cultivo de especies productoras de posibles fármacos.

Para seleccionar que organismos pueden ser buenos candidatos como “cultivables”, inicialmente es necesario hacer un análisis detallado de la bibliografía existente referente a su reproducción, ciclos de vida, alimentación y las condiciones medioambientales necesarias para su desarrollo. Un factor determinante en la elección del organismo es su índice de crecimiento que normalmente es directamente proporcional a su productividad, distribución y abundancia en su medio natural. Además de estos factores también deben ser tenidos en cuenta cuáles son las óptimas condiciones necesarias para que el organismo crezca. Temperatura, nivel de luz necesaria y otros parámetros clave nos darán una información muy valiosa para lograr su crecimiento en cautividad de forma óptima.

En nuestro caso, los factores más importantes para elección del organismo estarán relacionados tanto con los que afectan a la producción de los metabolitos secundarios que se esperan aislar, como con las actividades

³⁷⁰ Miyaoka H., Abe Y., Sekiya N., Mitome H., Kawashima E. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 901.

biológicas que poseen. Siguiendo estos criterios, se han realizado varios proyectos pioneros en el campo de la acuicultura con los siguientes organismos:³⁷¹

- El briozoo *Bugula neritina*: Con el fin de conseguir el suministro necesario de briostatina A para completar los ensayos clínicos contra el cáncer, se estudió el crecimiento del briozoo *Bugula neritina*. Después de intensos estudios realizados entre los años 1994 y 1998, se consiguió producir 200 mg/año de briostatina 1 a partir de 75 kg de organismo. Este compuesto se encuentra en la actualidad en fases clínicas avanzadas contra varios tipos de cáncer.
- El tunicado *Ecteinascidia turbinata*: De este organismo del cual se aísla ET-743 (Trabectedin, Yondelis®), fármaco anticanceroso comercializado por Pharmamar para el tratamiento de sarcoma en tejidos blandos y cáncer de ovario. Desde el año 1996-2000 se realizaron ensayos de acuicultura de este tunicado pero debido a problemas de diversa índole, el proyecto se abandonó y hoy en día se obtiene por semisíntesis a partir de cianosafracina obtenido a su vez de safracina B, un antibiótico aislado de la fermentación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.⁷⁸

II.2.2 Proyecto de acuicultura sobre la esponja *Acanthella cavernosa*

Acanthella cavernosa ha sido una esponja muy estudiada desde el punto de vista químico. Se conoce muy bien el entorno natural en donde crece y se desarrolla, por lo que desde el punto de vista de cultivo, sus condiciones de crecimiento pueden ser muy controladas. En los últimos 30 años se han aislado de esta especie fundamentalmente diterpenos con actividades prometedoras, siendo por tanto una muy buena candidata para ser cultivada en cautividad en un entorno controlado de acuicultura.

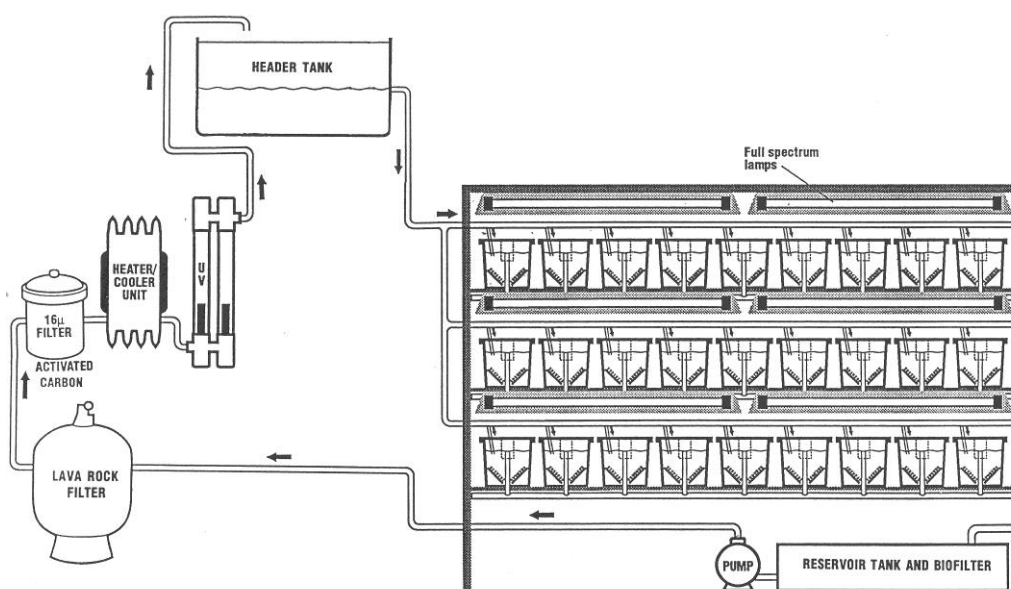


Figura 83. Sistema de crecimiento en cautividad Aqua-Farm System IITM adaptado para los experimentos de los protocolos de la esponja *A. cavernosa* utilizado en nuestro estudio.

³⁷¹ Mendola, D. *Biomol. Eng.* **2003**, *20*, 441.

Los metabolitos aislados de esta esponja, los kalihinenos, están biosintéticamente relacionados con el bicicloespiroesquiterpeno axisonitrilo aislado de la esponja *Acanthella klethra* (posiblemente *Acanthella cavernosa*). Estos sesquiterpenos muestran una actividad antibiótica y una potente actividad antimalárica.³⁷² Mediante una colaboración de la empresa Calbiomarine Technologies Inc. con el profesor Phillip Crews de la Universidad de California en Santa Cruz, se propuso en 1993 estudiar el crecimiento de esta esponja en cautividad. Para ello la empresa colaboradora del proyecto diseñó un sistema que reproducía de manera muy fidedigna el medio natural en donde vive la esponja, el sistema Aqua-Farm II™ tal como se muestra en la Figura 83.

Este sistema permitía reproducir las condiciones de temperatura y de luz, así como el ciclo de día-noche que sufre una esponja en su medio natural. Otro de los objetivos del proyecto implicaba mejorar la producción de los metabolitos secundarios producidos con este sistema en relación con los que se obtienen de los especímenes que viven en su hábitat natural. Para estudiar el crecimiento de la esponja *A. cavernosa* se siguió los mismos protocolos y la misma metodología que dieron unos resultados óptimos en la esponja *Rhopalocides odorabile*,³⁷³ donde se encontró que las cantidades de diterpenos aislados podían variar según las condiciones de iluminación y profundidad.

Antes de realizar los estudios de acuicultura utilizando diferentes protocolos (Esquema 12 y Esquema 13), se hizo un estudio químico previo de los diterpenos presentes en las esponjas recolectadas en su medio natural para poder llevar a cabo posteriormente las comparaciones correspondientes.



Figura 84. Especímen de *A.cavernosa* en su medio natural.

³⁷² Angerhofer C. K., Pezzuto J. M., König G. M., Wright A. D., Sticher O. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55 1787.

³⁷³ Thompson J. E., Murphy P. T., Bergquist P. R., Evans E. A. *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, 15, 595.

II.3 Resultados y discusión



Para llevar a cabo este estudio químico se planteó el siguiente plan de trabajo:

1. Aislamiento y determinación estructural de los productos naturales de los extractos de las esponjas recolectadas directamente en su hábitat natural y la puesta a punto de la cuantificación de los compuestos aislados.
2. Estudio y cuantificación de los productos naturales de los extractos de las esponjas procedentes del sistema de acuicultura tratadas según los protocolos 1-4 (Esquema 12 y Esquema 13).

II.3.1 Estudio químico de *Acanthella cavernosa* en su hábitat natural

El estudio químico del extracto metanólico de las esponjas recolectadas directamente de su hábitat natural trajo consigo el aislamiento e identificación de tres compuestos ya descritos en la bibliografía^{374,375,376} y siete nuevos productos naturales que se describen a continuación.

II.3.1.1 Identificación y clasificación de la esponja

Todos los especímenes de *Acanthella cavernosa* fueron recolectados a una profundidad entre 3 y 13 metros en las Islas Fiya (Océano Pacífico) cerca de Pacific-Harbor en los arrecifes próximos a la laguna Benga (Figura 85) durante noviembre 1992. Se recogieron 0.4 Kg de organismos, en distintas localizaciones. Los especímenes se preservaron en una mezcla de *n*-PrOH:H₂O (1:1) y fueron transportados a los laboratorios de la Universidad de California (Santa Cruz, EEUU) para su estudio.



Figura 85. Lugar de recolección de las esponjas *A. cavernosa*.

La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. R. W. M. van Soest del Instituto de Zoología Taxonómica de la Universidad de Ámsterdam.

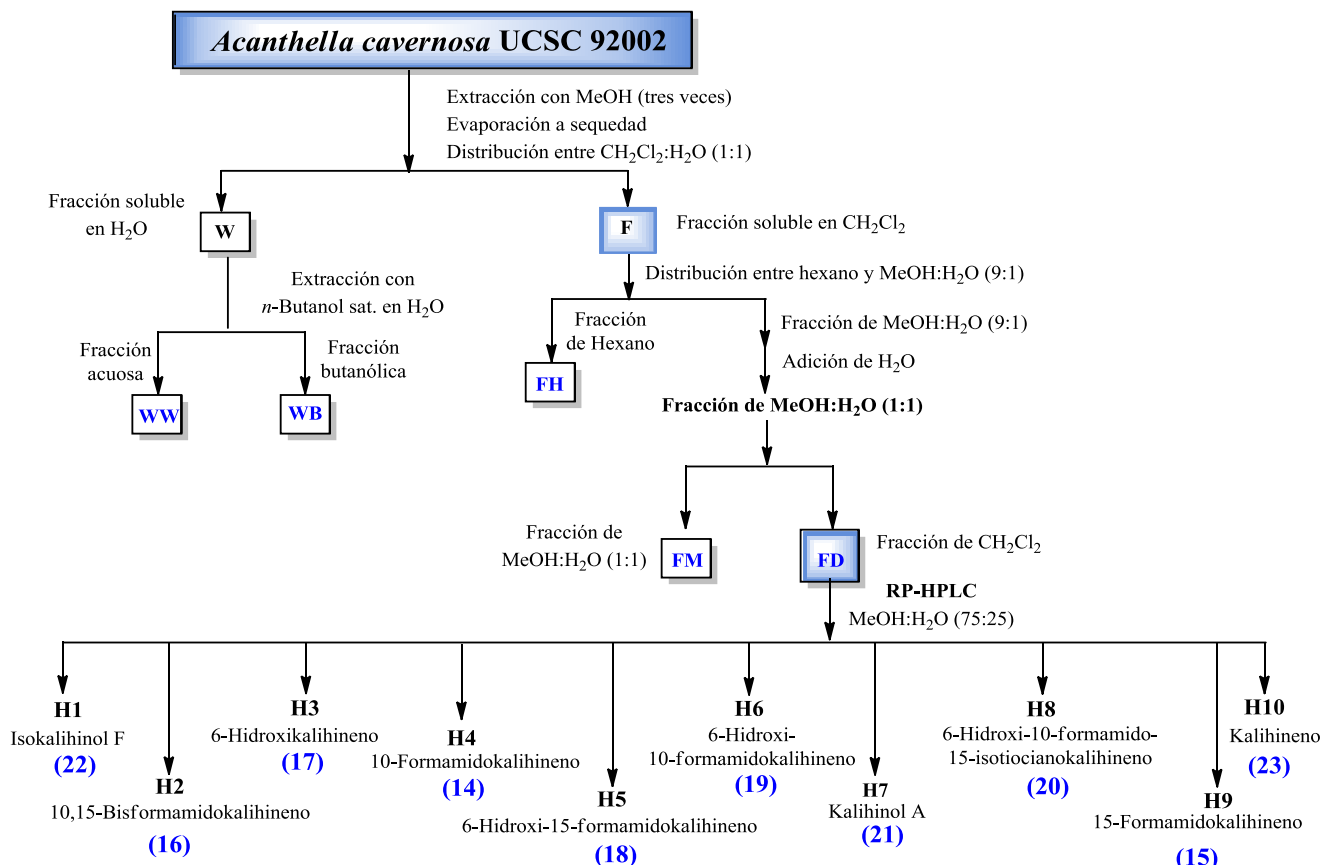
³⁷⁴ Chang, C. W. J., Patra A., Roll D. M., Scheuer P. J., Matsumoto G. K., Clardy J. J. *Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4644.

³⁷⁵ Omar S., Albert C., Fanni T., Crews P. J. *Org. Chem.* **1988**, *53*, 5971.

³⁷⁶ Fusetani N., Yasumuro K., Kawai H., Natori T., Brinen L., Clardy J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3599.

II.3.1.2 Extracción y fraccionamiento

Las esponjas codificadas con la referencia UCSC 92002, después de ser transportadas a la Universidad de California Santa Cruz en *n*-PrOH:H₂O (1:1), se extrajeron tres veces con MeOH, se evaporó el disolvente y el residuo obtenido se sometió al fraccionamiento mostrado en Esquema 10.



Esquema 10. Extracción y fraccionamiento de *Acanthella cavernosa* y la purificación de la fracción de diclorometano **FD**.

El residuo obtenido después de llevar a sequedad el extracto metanólico de la esponja, se distribuyó entre diclorometano y agua (1:1) obteniéndose dos fracciones, una fracción soluble en agua denominada **W** y otra en diclorometano, nombrada **F**. Los compuestos solubles en diclorometano se distribuyeron entre hexano y metanol, al cual se le adicionó un 10% de agua para generar dos fases, obteniéndose de este modo la fracción de hexano (**FH**) y la fracción de compuestos solubles en metanol agua al 90%. A la fracción H₂O/MeOH al 90% se le adicionó agua hasta obtener una composición del 50% H₂O/MeOH, la cual se extrajo con diclorometano para dar lugar a dos nuevas fracciones: los compuestos solubles en H₂O/MeOH al 50% (**FM**) y los compuestos solubles en diclorometano (**FD**). La extracción de la fracción **W** con *n*-butanol saturado de agua dio lugar a la fracción acuosa (**WW**) y a la fracción butanólica (**WB**).

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de la fracción de hexano (**FH**) mostraron la presencia de esteroides, por lo que no se continuó su estudio. En cambio, los espectros de RMN de ¹³C de la fracción de diclorometano **FD** revelaron unos desplazamientos químicos alrededor de 82 ppm, que sugirieron la presencia de compuestos que contienen el anillo de furano presente en los kalihinenos o kalihinoles, por lo que se procedió a su posterior estudio.

II.3.1.3 Aislamiento y purificación

La fracción de diclorometano **FD** se purificó mediante HPLC con una columna semipreparativa C18 ODS 10- μ m, usando como fase móvil una mezcla binaria de MeOH:H₂O (75:25).

Para la elucidación estructural de los compuestos aislados se procedió a un detallado estudio espectroscópico que incluyó:

-Espectroscopia de RMN monodimensional (RMN de ¹H, ¹³C y DEPT-135) y bidimensional (¹H -¹H COSY, HMBC, HMQC, NOESY) y espectrometría de masas modo FAB ion positivo de baja y alta resolución.

De esta forma se lograron aislar e identificar diez compuestos de origen diterpénico (**14-23**), de los cuales siete de ellos (**14-20**) resultaron ser nuevos productos naturales. En la Figura 86 se presentan los compuestos aislados de *A. cavernosa*, agrupados según su esqueleto y sus sustituyentes:

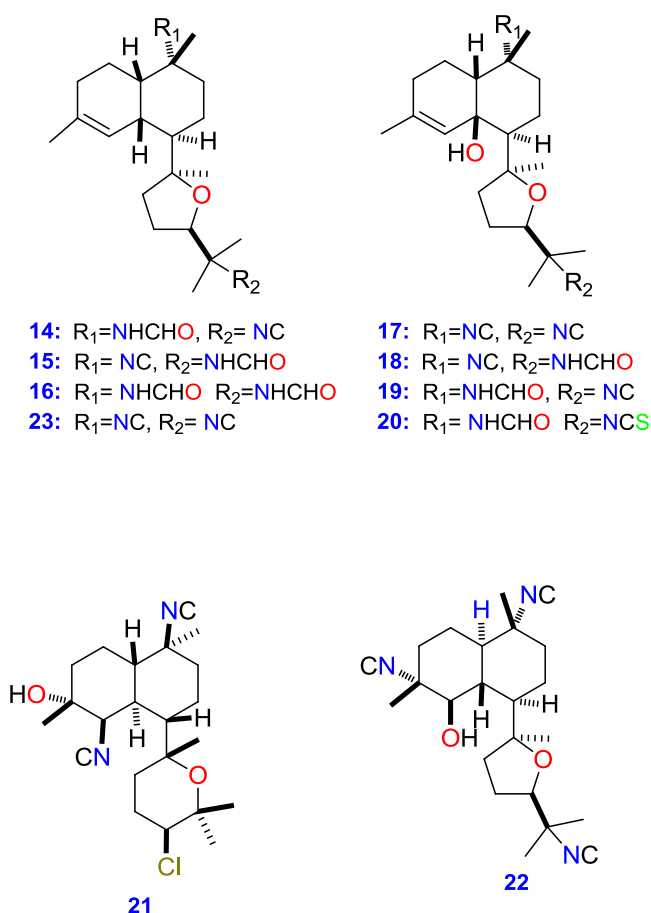


Figura 86. Compuestos aislados de la esponja *Acanthella cavernosa*.

II.3.1.4 Determinación estructural

El análisis de los datos espectroscópicos de los nuevos metabolitos nos indicó que en su gran mayoría están estructuralmente relacionados con el kalihineno (**23**) (Figura 87). Este compuesto, que resultó ser el componente ditépenico mayoritario de la fracción **FD**, se utilizó como referencia para elucidar las estructuras de los nuevos metabolitos aislados. Con el fin de facilitar las comparaciones estructurales, se recogen los datos de RMN de ^{13}C de los compuestos **14**, **15**, **17**, **18** y **23** en la Tabla 17.

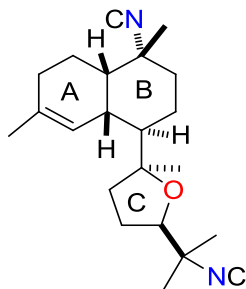


Figura 87. Estructura de kalihineno (**23**).

Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C NMR (en CDCl_3) de kalihineno (**23**) y los derivados aislados de *Acanthella cavernosa*.

Átomo	23	14 ¹	14 ²	15 ¹	15 ²	17	18 ^c	18 ^t
1	43.8	41.5	45.8	43.8	43.8	50.3	50.3	50.6
2	20.4	19.0	19.4	20.4	20.4	21.7	22.1	22.1
3	30.7	30.7	30.9	30.7	30.7	30.3	30.3	30.3
4	131.0	130.4	130.6	131.6	131.3	131.9	131.1	131.6
5	126.3	127.1	126.9	126.7	126.8	131.4	132.1	132.8
6	34.7	34.9	35.4	34.7	34.7	75.4	75.6	75.6
7	48.1	48.58	48.3	47.6	48.2	51.6	50.8	52.1
8	24.7	24.6	24.5	24.9	24.9	23.6	23.6	23.6
9	33.9	33.3	32.6	33.9	34.0	35.7	35.8	35.8
10	60.4	56.7	55.3	60.9	60.9	61.8	63.0	63.0
11	86.5	86.6	86.8	86.2	86.1	87.3	86.9	86.9
12	37.2	37.2	37.2	37.7	37.8	38.9	39.8	39.7
13	25.7	25.7	25.7	25.1	25.1	25.6	25.0	25.0
14	82.9	82.8	82.7	84.2	84.2	83.1	84.5	84.3
15	60.9	60.5	60.4	54.5	55.7	60.2	54.6	-
16	26.3	26.3	26.4	27.2	24.7	26.3	27.2	24.8
17	25.1	25.1	25.1	23.9	21.7	25.5	24.3	21.8
18	19.7	19.6	19.6	19.5	20.0	22.9	2.6	22.6
19	23.3	23.5	23.3	23.3	23.3	23.6	23.0	23.0
20	26.8	27.2	23.4	26.8	26.8	30.2	30.3	30.0
	153.2	153.9	153.9	154.6	-	154.6	-	-
	153.4	162.7	160.1	163.2	160.8	153.5	163.3	160.9

¹t = Isómero *trans* en el grupo NHCHO , ²c = Isómero *cis* en el grupo NHCHO

II.3.1.4.1 10-Formamidokalihinenol (14)

La fórmula molecular $C_{22}H_{34}N_2O_2$ del compuesto **14** fue establecida por espectrometría de masas de alta resolución (+) FAB a partir del ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 359.2693. En el espectro de masas de baja resolución (+) FAB además se observó el ión pseudomolecular a m/z 513.2 $[M+Magic\ Bullet]^+$ (Figura 88).

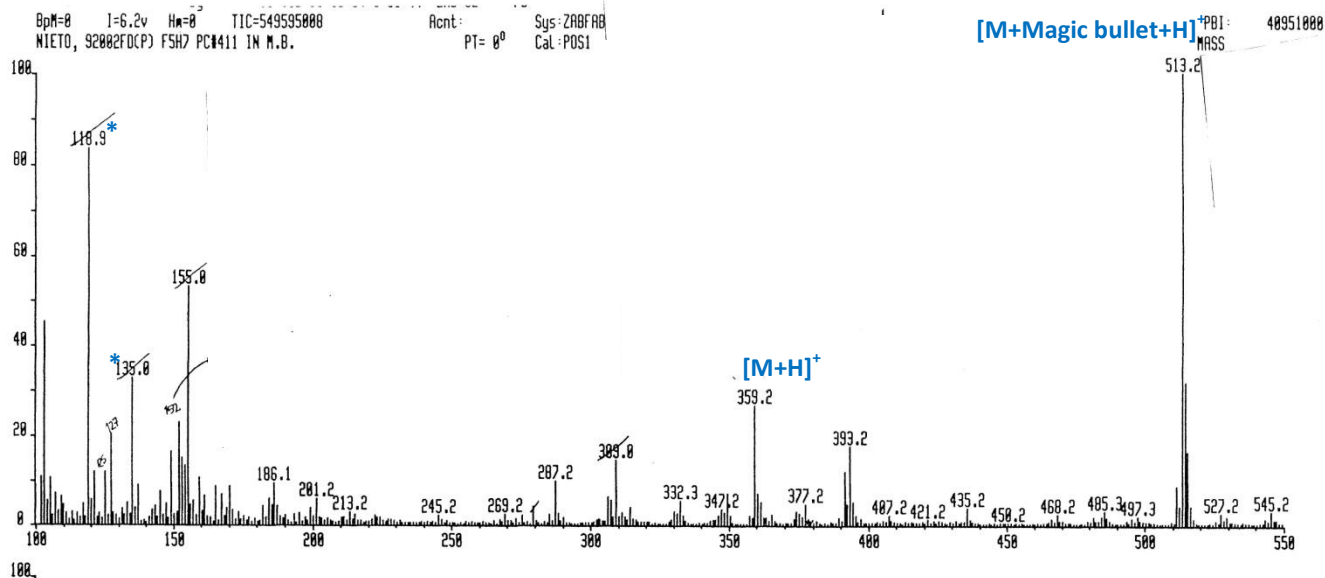


Figura 88. Espectro de masas (+)-FAB, (matriz Magic Bullet) del compuesto **14**.

Esta información conjuntamente con la obtenida de la comparación de los datos espectrales de RMN de ^{13}C del compuesto **14** con los de kalihinenol (**23**) (ver Tabla 17), permitió deducir la presencia en **14** de los tres anillos A, B y C. La similitud de los desplazamientos químicos de los carbonos C1 a C9 y C11 a C14, conjuntamente con la diferencia de 3.7 ppm en el desplazamiento químico del carbono C10 entre ambos compuestos, que ambos compuestos sólo se diferencian en el sustituyente de la posición C10.

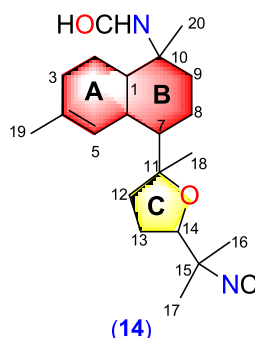


Figura 89. Estructura plana del compuesto **14**.

La presencia del grupo formamido en **14**, en vez de un grupo isonitrilo de **23** en el anillo B, se dedujo a partir de la diferencia de 16 uma (un átomo de oxígeno) entre el peso molecular de ambos compuestos, confirmándose posteriormente a partir de la duplicación de señales en los espectros de RMN de **14**. Así, las señales duplicadas se observaron a δ_H 8.23 (d, $J = 12.0$ Hz) y δ_H 8.06 (d, $J = 2.0$ Hz) en el espectro de RMN de 1H .

De todos estos datos se deduce que la estructura del compuesto **14** es la que se muestra en la Figura 89. Este compuesto no había sido descrito con anterioridad, por lo que resultó ser un nuevo producto natural al que se le dió el nombre de 10-formamidokalihiheno.

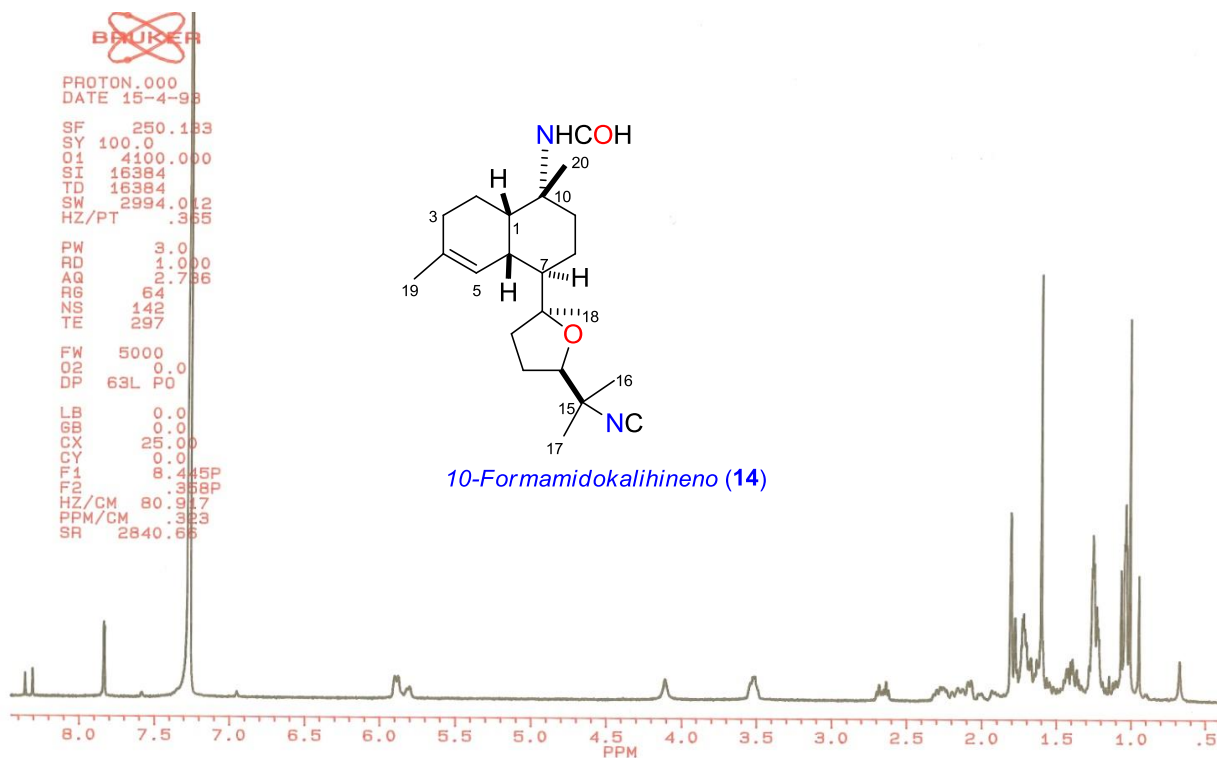


Figura 91. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, C_6D_6) del compuesto **14**.

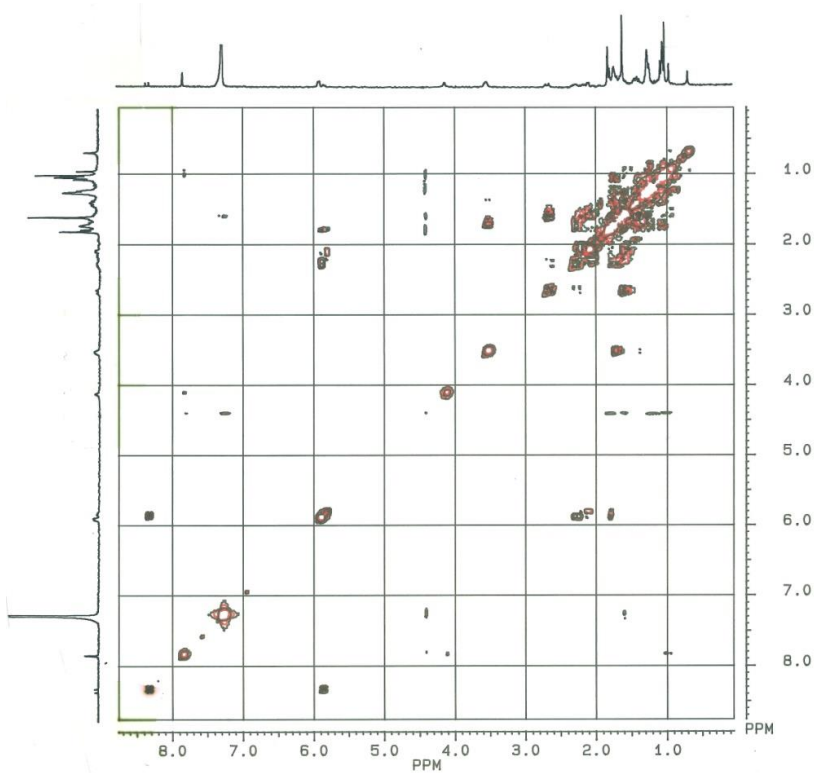


Figura 92. Espectro ^1H - ^1H COSY (250 MHz, C_6D_6) del compuesto **14**.

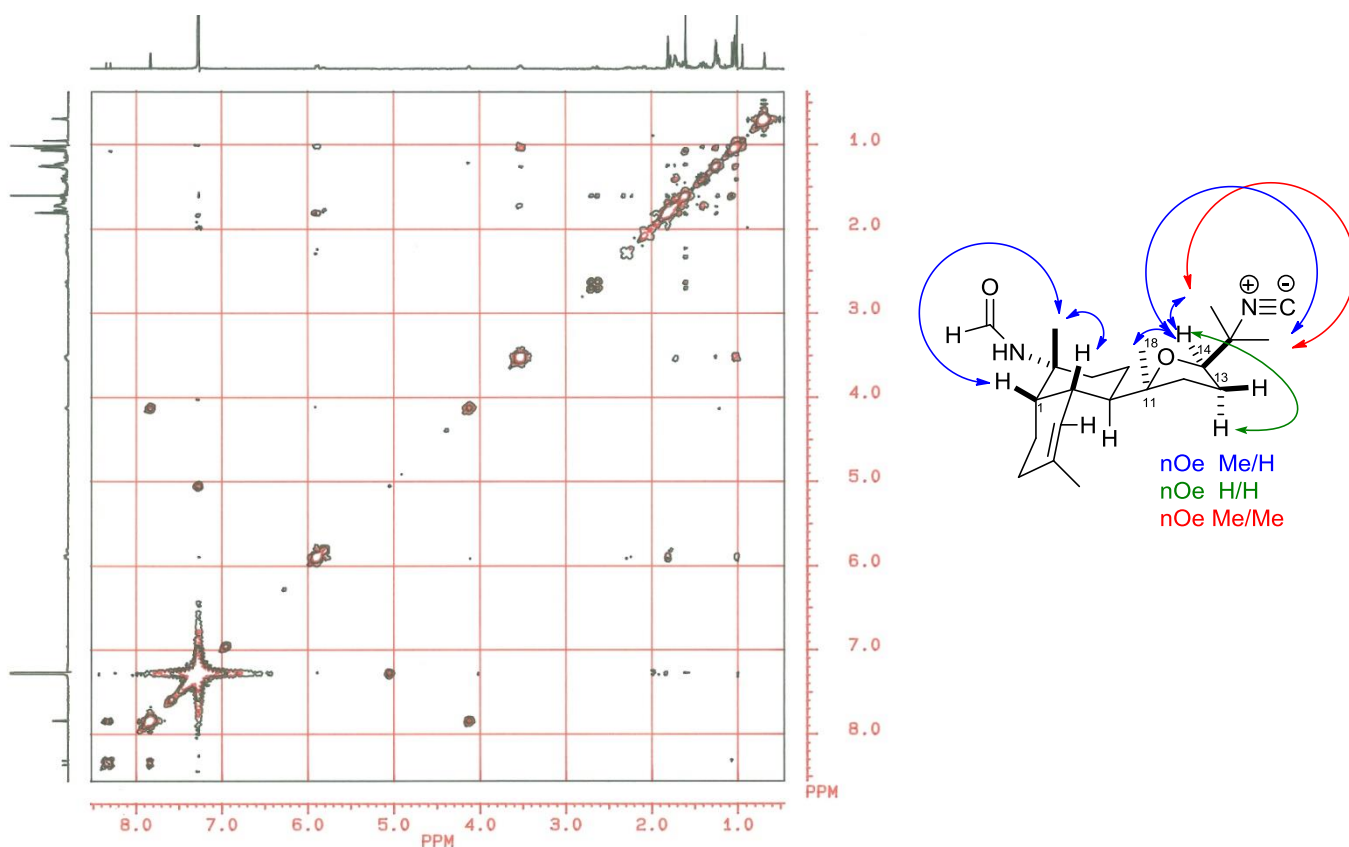


Figura 93. Espectro ^1H - ^1H NOESY (250 MHz, C_6D_6) del compuesto **14** y correlaciones nOe más importantes.

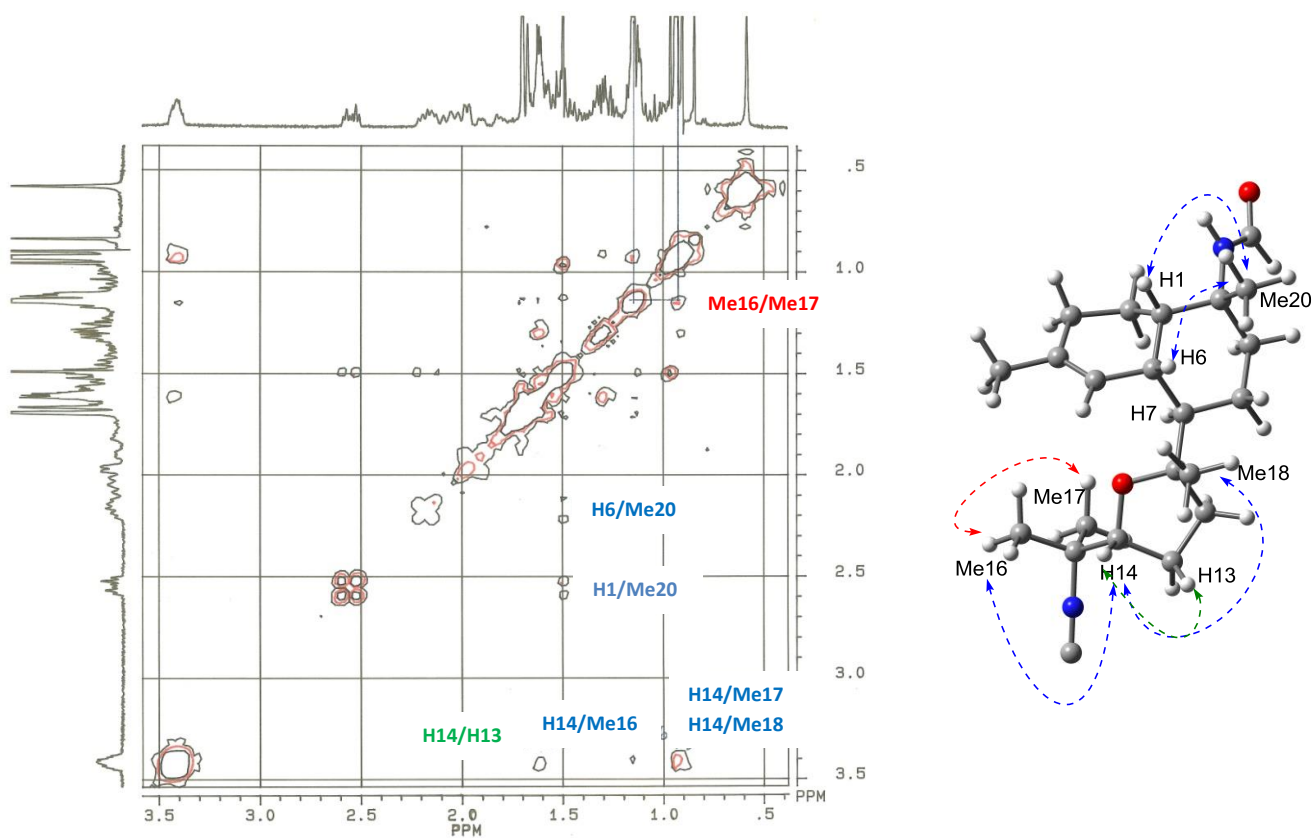


Figura 94. Ampliación del espectro ^1H - ^1H NOESY del compuesto **14** y correlaciones nOe más importantes.

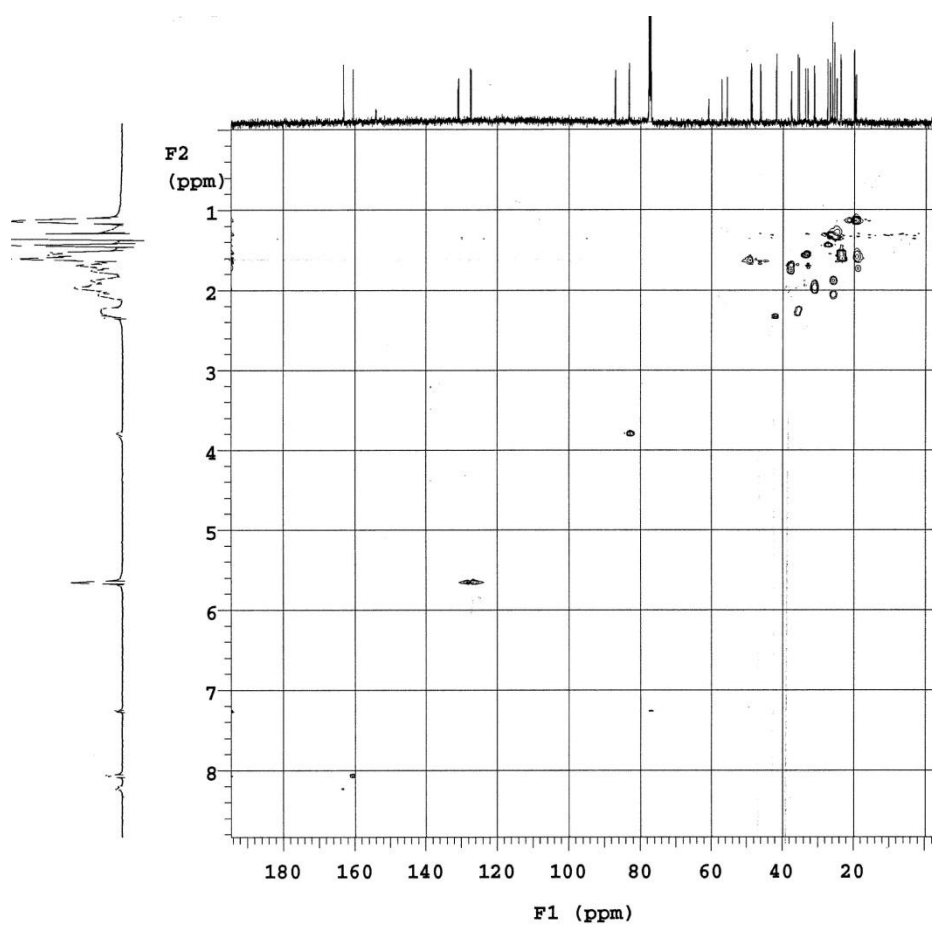
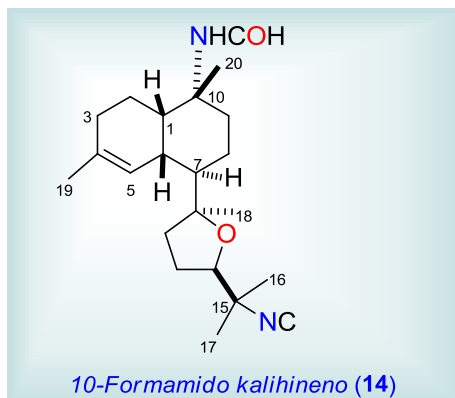


Figura 95. Espectro HMQC (500 MHz, C_6D_6) del compuesto **14**.

Tabla 18. Datos de RMN de ^{13}C y ^1H (500 MHz, CDCl_3) de los isómeros *cis/trans* del compuesto 10-formamidokalihineno (**14**)


Posición	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz) <i>cis</i>	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz) <i>trans</i>	δ_{C} (ppm) <i>cis</i>	δ_{C} (ppm) <i>trans</i>
1	1.60 m	2.30 m	45.8	41.5
2/2'	1.57 m/1.72 m	1.57 m	19.4	19.0
3	1.96 m	1.96 m	30.9	30.7
4			130.6	130.4
5	5.66 sa	5.66 sa	126.9	127.1
6	2.26 m	2.23 m	35.4	34.9
7	1.60 m	1.60 m	48.3	48.58
8/8'	1.32.m/1.54 m	1.32 m/1.54 m	24.5	24.6
9	1.54 m	1.54 m	32.6	33.3
10			55.3	56.7
11			86.8	86.6
12/12'	1.76 m/1.71 m	1.76 m/1.71 m	37.2	37.2
13/13'	2.06 m/1.87 m	2.06 m/1.87 m	25.7	25.7
14	3.80 m	3.80 m	82.7	82.8
15			60.4	60.5
Me 16	1.31 t 1.6 Hz	1.31 t 1.6	27.6	26.3
Me 17	1.34 t 1.6 Hz	1.34 t 1.6	25.1	25.1
Me 18	1.13 s	1.13 s	19.6	19.6
Me 19	1.61 sa	1.59 sa	23.3	23.5
Me 20	1.53 s	1.43 s	23.4	27.2
-NC			153.9	153.9
-COH	8.06 d 2.0 Hz	8.23 d 12.0	160.1	162.7
-NH	5.18 d 2.0 Hz	5.75 d 12.0	-	-

II.3.1.4.2 15-Formamidokalihinenol (15)

Este compuesto se aisló de fracción de HPLC **FDH9**. Su fórmula molecular $C_{22}H_{34}N_2O_2$ fue establecida por espectrometría de masas de alta resolución (+)-FAB a partir de su ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 359.2690 (Figura 96), que era concordante con la fórmula APT obtenida a partir de sus espectros de RMN ^{13}C y DEPT-135 (Figura 98).

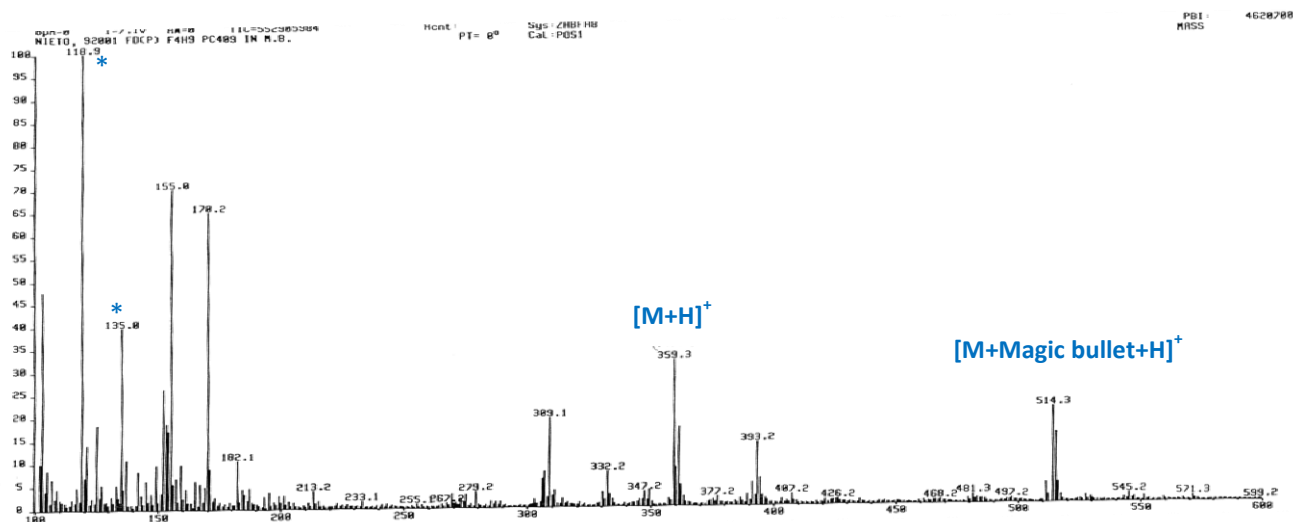


Figura 96. Espectro de masas (+)-FAB de **15** (matriz Magic Bullet*).

El hecho de que **15** posea la misma fórmula que **14** y que ambos compuestos muestren unos datos espectroscópicos de RMN de 1H (Figura 97) y RMN ^{13}C / DEPT-135 (Figura 98) muy semejantes, sugirió que se trataban de dos compuestos isoméricos. El desdoblamiento de las señales correspondientes a los metilos Me16/Me17 (δ_H 1.20/1.33 y δ 1.31/1.38 respectivamente) y del protón H14 (δ 3.77 dd y 3.85 dd) y C-15 δ_C 54.5 (s) y 55.7 (s) en sus espectros de RMN indicaron que el grupo formamido estaba ahora unido al carbono C15 en **15** en vez de C10 en **14**. Tal como ocurre en **14**, la integración de las señales clave en el espectro de RMN 1H de **15** en $CDCl_3$ indicó que la proporción de los rotámeros *trans/cis* del grupo formamido era 71:29.

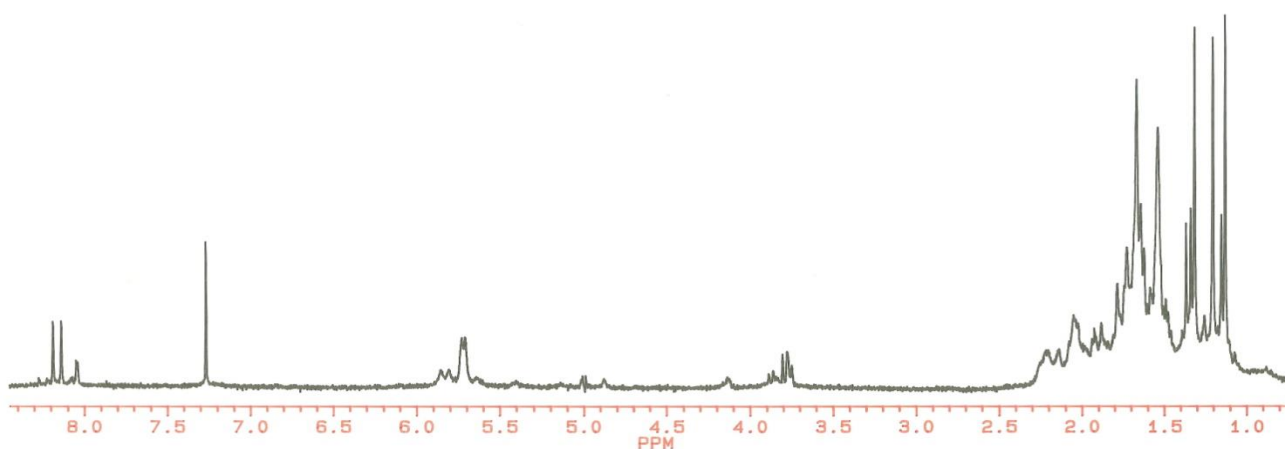


Figura 97. Espectro de RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$) del compuesto **15**.

La estereoquímica relativa propuesta para el compuesto **15** se basó en la similitud de los valores de los desplazamientos químicos de los carbonos C1, C6, C7, C11, C14 y en el metilo Me20 con los de los compuestos **23** y **14** descritos anteriormente.

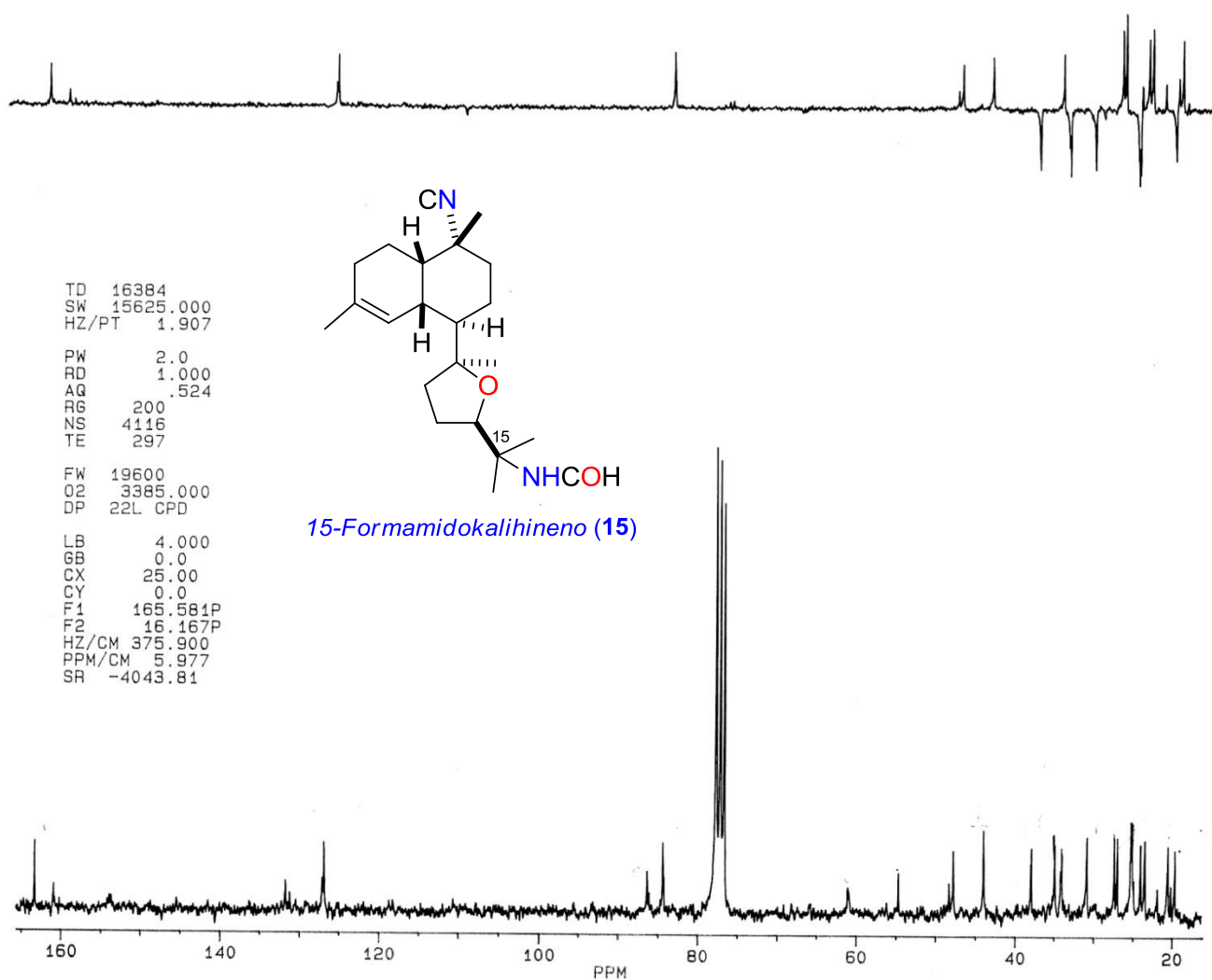
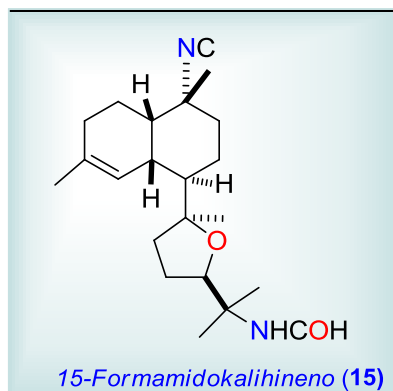


Figura 98. Espectros de RMN ^{13}C y DEPT (62.3 MHz, CDCl_3) del compuesto **15**.

Todos estos datos permitieron deducir que la estructura del compuesto **15** es como la mostrada en la Figura 98, resultando ser un nuevo producto natural al que se dio el nombre de 15-formamidokalihiheno.

Tabla 19. Datos de RMN de ^{13}C y ^1H (250 MHz, CDCl_3) de los isómeros *cis/trans* del compuesto 15-formamidokalihineno (**15**).


Posición	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz) <i>cis</i>	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz) <i>trans</i>	δ_{C} (ppm) <i>cis</i>	δ_{C} (ppm) <i>trans</i>
1			43.8	43.8
2/2'			20.4	20.4
3			30.7	30.7
4			131.3	131.6
5	5.71 da	5.71 da	126.8	126.7
6			34.7	34.7
7			48.2	47.6
8/8'			24.9	24.9
9			34.0	33.9
10			60.9	60.9
11			86.1	86.2
12/12'			37.8	37.7
13/13'			25.1	25.1
14	3.85 dd 7.2, 6.8	3.77 dd 7.2, 6.8	84.2	84.2
15			55.7	54.5
Me 16	1.33 s	1.20 s	24.7	27.2
Me 17	1.38 s	1.31 s	21.7	23.9
Me 18	1.14 s	1.12 s	20.0	19.5
Me 19	1.63 sa	1.65 sa	23.3	23.3
Me 20	1.53 sa	1.53 sa	26.8	26.8
-NC			154.6	154.6
-COH	8.03 d 1.8	8.16 d 12.3	160.8	163.2
-NH	4.12 sa	5.82 dd 12.3		

II.3.1.4.3 10,15-Bisformamidokalihineno (16)

El compuesto **16** se aisló de la fracción de HPLC **FDH2**, en forma de sólido blanco. En su espectro de masas de alta resolución (+)-FAB se observó el ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 377.2794 concordante con la fórmula molecular $C_{22}H_{36}N_2O_3$. La diferencia de 17 unidades de su peso molecular en relación con el de kalihineno (**23**) sugirió que este compuesto presentaba átomos de O e H adicionales.

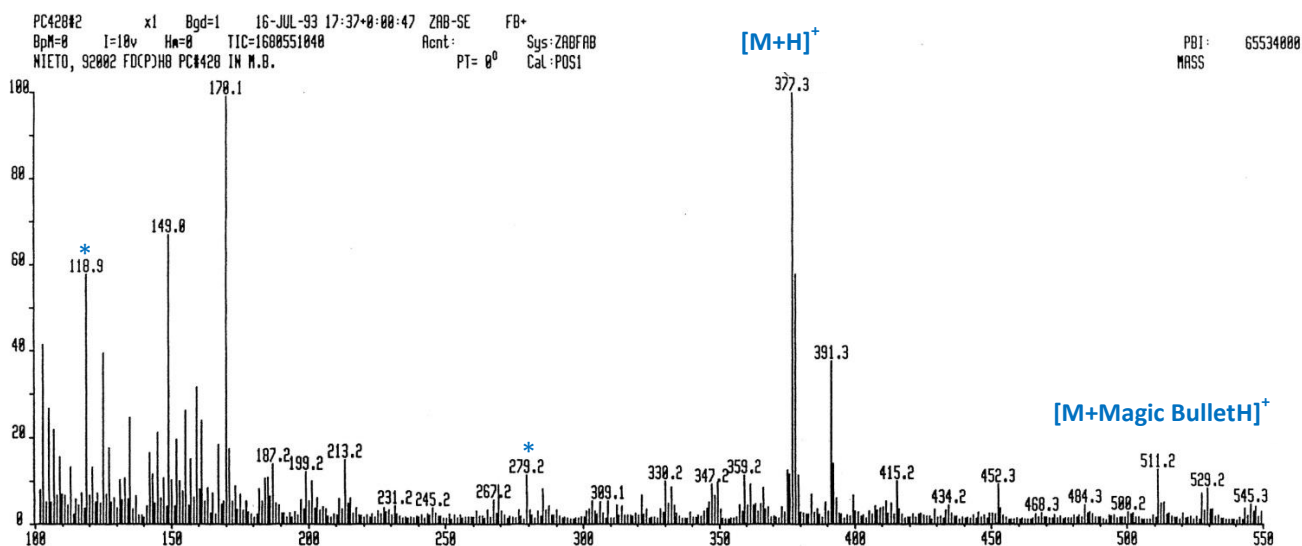


Figura 99. Espectro de masas (+)-FAB (matriz Magic Bullet*) de **16**.

El espectro de RMN de 1H de **16** mostró varias señales entre δ_H 8.0-8.3 y 4.5-5.9 que sugirieron la presencia de dos grupos formamido, siendo el resto de las señales muy similares a las de los dos compuestos anteriores.

La existencia de estos dos grupos formamido con equilibrio isomérico *cis/trans* restringido trae consigo que su espectro de RMN de 1H sea mucho más complicado debido a la presencia de los cuatro posibles isómeros: 10-*cis*-formamido/15-*cis*-formamido, 10-*cis*-formamido/15-*trans*-formamido, 10-*trans*-formamido/15-*cis*-formamido y 10-*trans*-formamido/15-*trans*-formamido, todos ellos en diferentes proporciones. Los grupos metilo Me20, Me16 y Me17 resuenan entre 1.2 y 1.5 ppm.

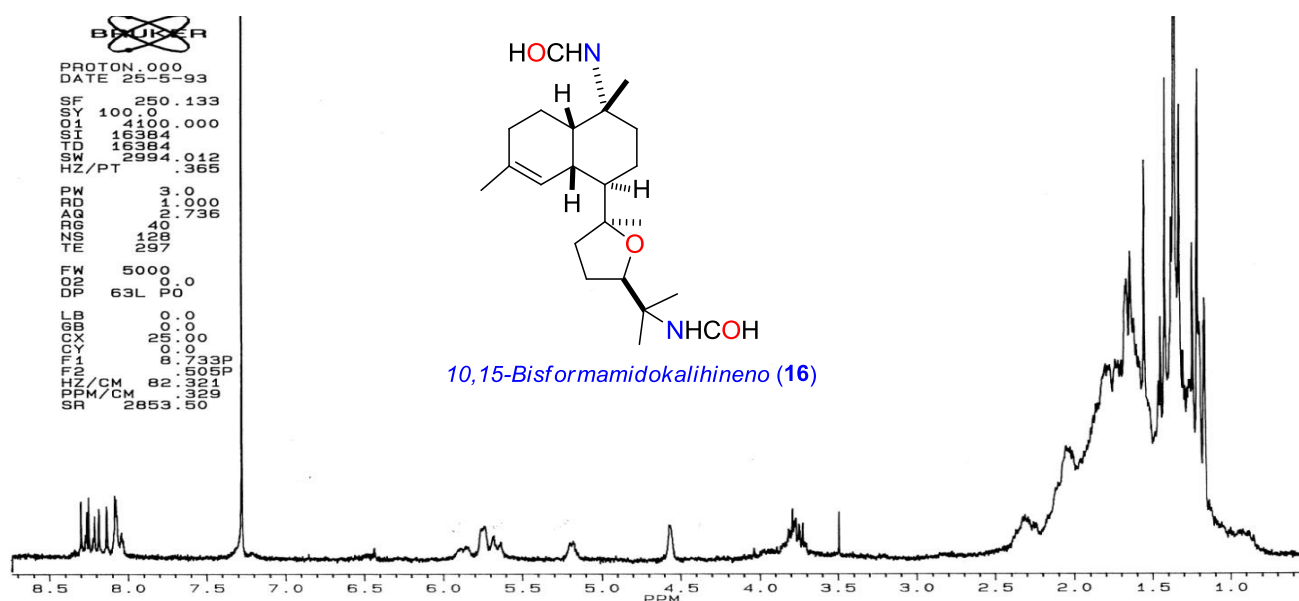
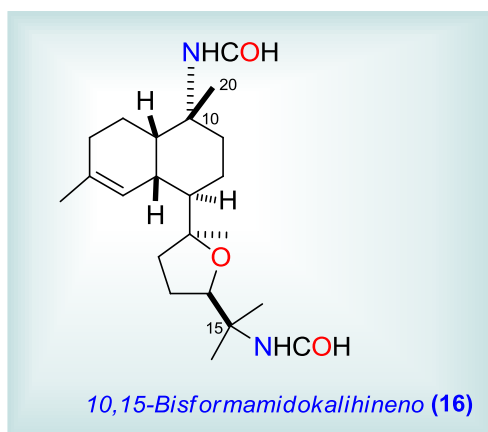


Figura 100. Espectro de RMN 1H del (250 MHz, $CDCl_3$) compuesto **16**.

Debido a la poca cantidad de compuesto no pudieron obtenerse más experimentos de RMN, por ello la estereoquímica es tentativa y se basa en las analogías con los compuestos 10-formamidokalihinenos (**14**), 15-formamidokalihinenos (**15**) y kalihinenos (**23**).

Tabla 20. Datos de RMN ^1H del compuesto **16**.



Posición	δ_{H} (ppm) mult. J (Hz)
5	5.75 sa
14	3.75-3.85 m
Me 16	1.20 s/ 1.32 s
Me 17	1.37 s/1.42 s
Me 18	1.20 s
Me 19	1.60 sa
Me 20	1.47 s/1.55 s
-NC	4.55 sa/5.23 sa 5.70 da/5.89 da
-COH	8.03 d, 8.0
-NH	4.12 sa

II.3.1.4.4 6-Hidroxikalihineno (17)

El compuesto **17** se aisló de la fracción de HPLC **FDH3**, lográndose recrystalizar en EtOH en forma de cristales incoloros. Su fórmula molecular $C_{22}H_{32}N_2O_2$ fue establecida a partir del espectro de masas de alta resolución (+)-FABMS de su ion pseudomolecular $[M+Magic\ Bullet+H]^+$ a m/z 511.2678 ($C_{26}H_{43}N_2O_4S_2$, Δ 1.4 mmu).

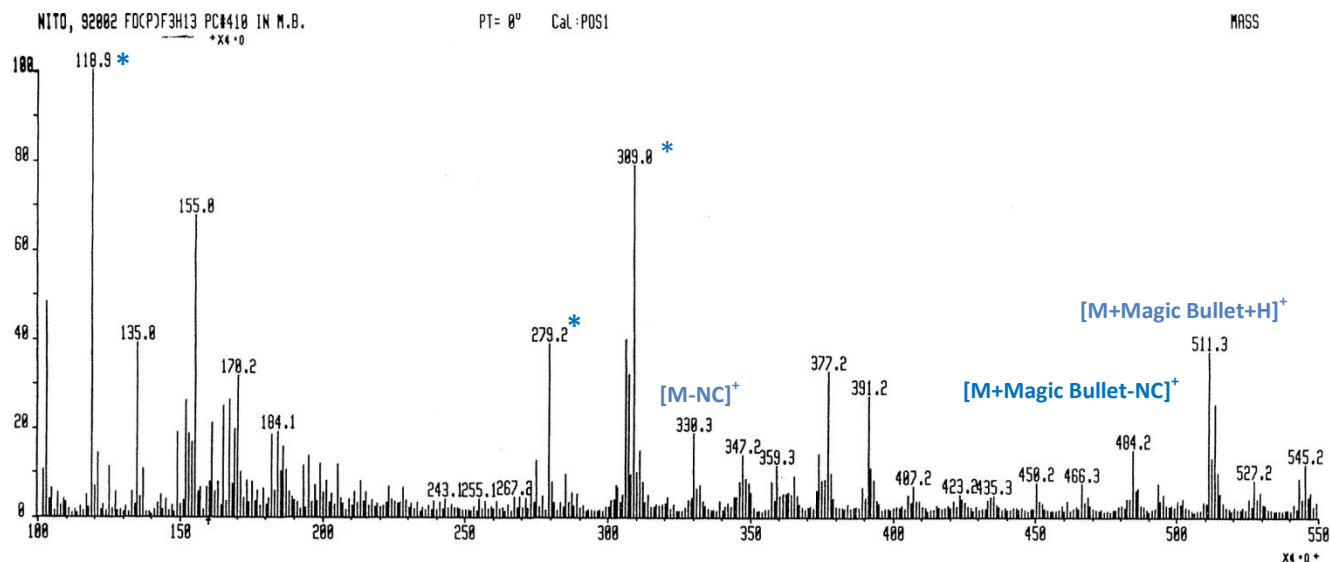


Figura 101. Espectro de masas (+)-FAB del compuesto **17** (matriz Magic Bullet*).

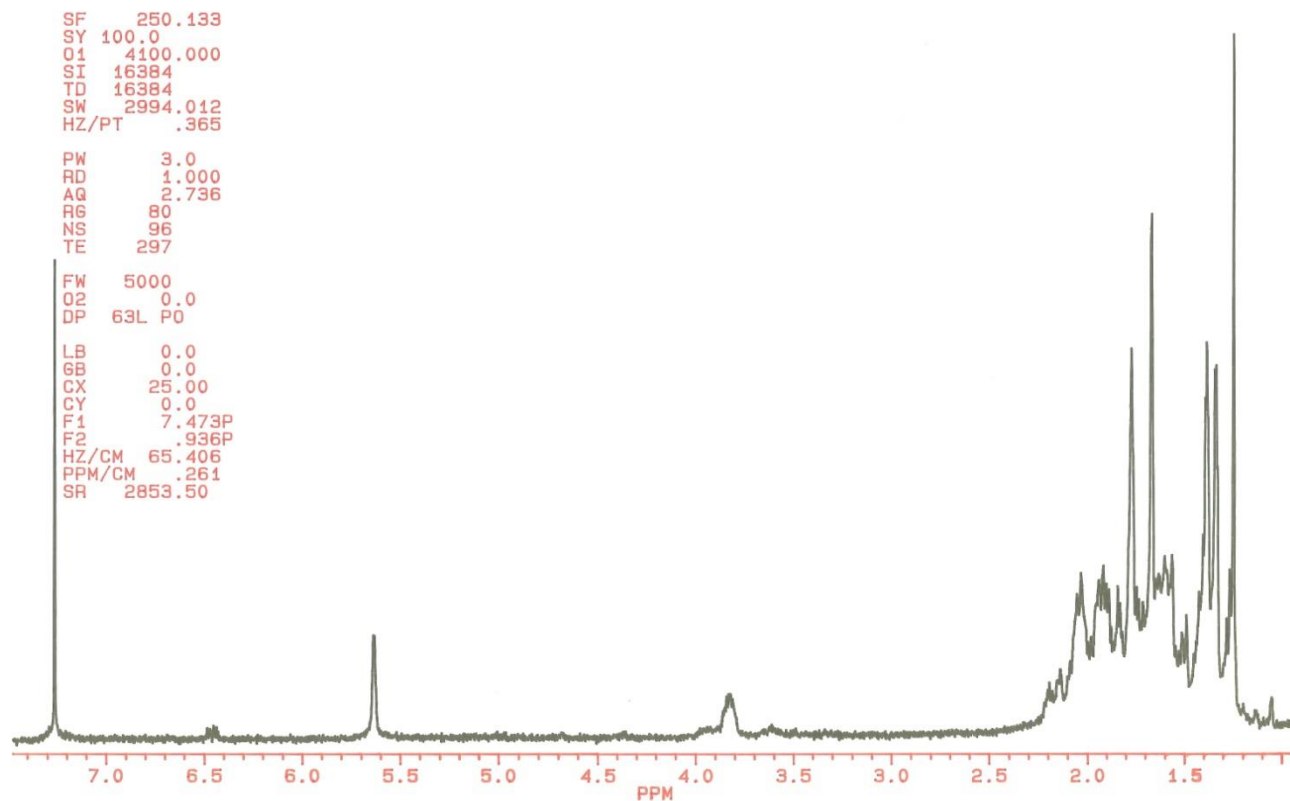


Figura 102. Espectro de RMN de 1H (250 MHz, $CDCl_3$) del compuesto **17**.

Los espectros de RMN de ^{13}C (Figura 103), DEPT-90 (Figura 104) y DEPT-135 (Figura 105) del compuesto **17** mostraron dos tripletes anchos ($J = 5\text{ Hz}$) a $\delta_{\text{C}} 61.8$ y $\delta_{\text{C}} 60.2$ correspondientes a los carbonos cuaternarios C10 y C15 que indicaron la presencia de dos grupos isociano. Los desplazamientos químicos del espectro de RMN de ^{13}C de **17** y los de kalihineno (**23**) son muy similares (Tabla 17), a excepción de pequeñas diferencias en los carbonos C1 $\delta_{\text{C}} 50.3$ (d), C7 $\delta_{\text{C}} 51.6$ (d), C11 $\delta_{\text{C}} 87.3$ (s) y C14 $\delta_{\text{C}} 83.1$ (s). La existencia de una señal adicional de un carbono cuaternario a $\delta_{\text{C}} 75.4$ (s) en **17** y la ausencia de la señal del carbono metínico C6 a $\delta_{\text{C}} 34.7$ en kalihineno (**23**), sugieren la presencia de un sustituyente oxigenado sobre dicho carbono. La diferencia de 16 unidades entre los pesos moleculares de **17** y **23** indicó que ese sustituyente debe de ser un grupo hidroxilo.

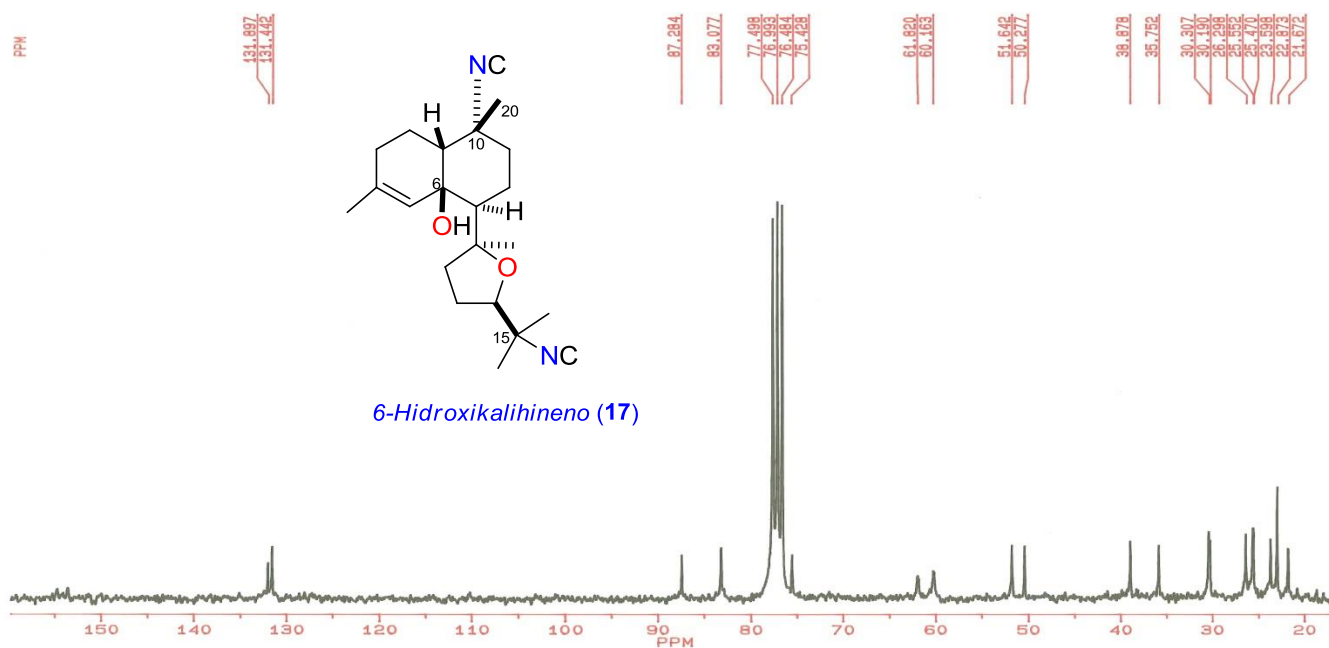


Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C (62.3 MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.

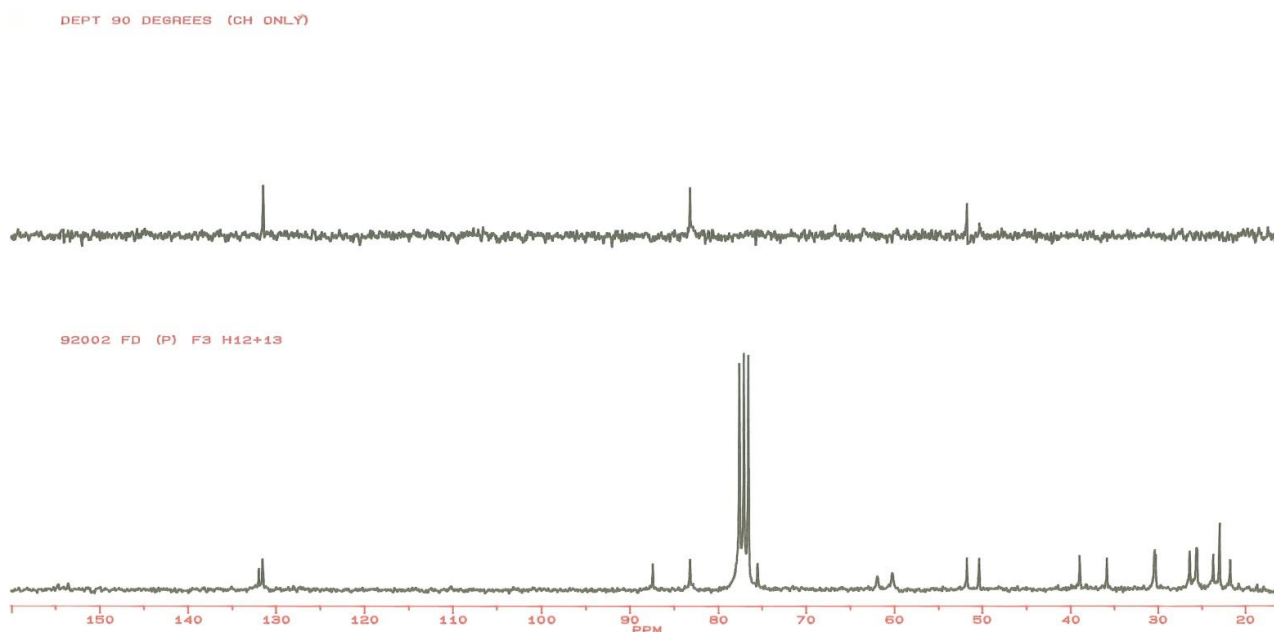


Figura 104. Espectros de RMN de ^{13}C y DEPT-90 (62.3 MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.

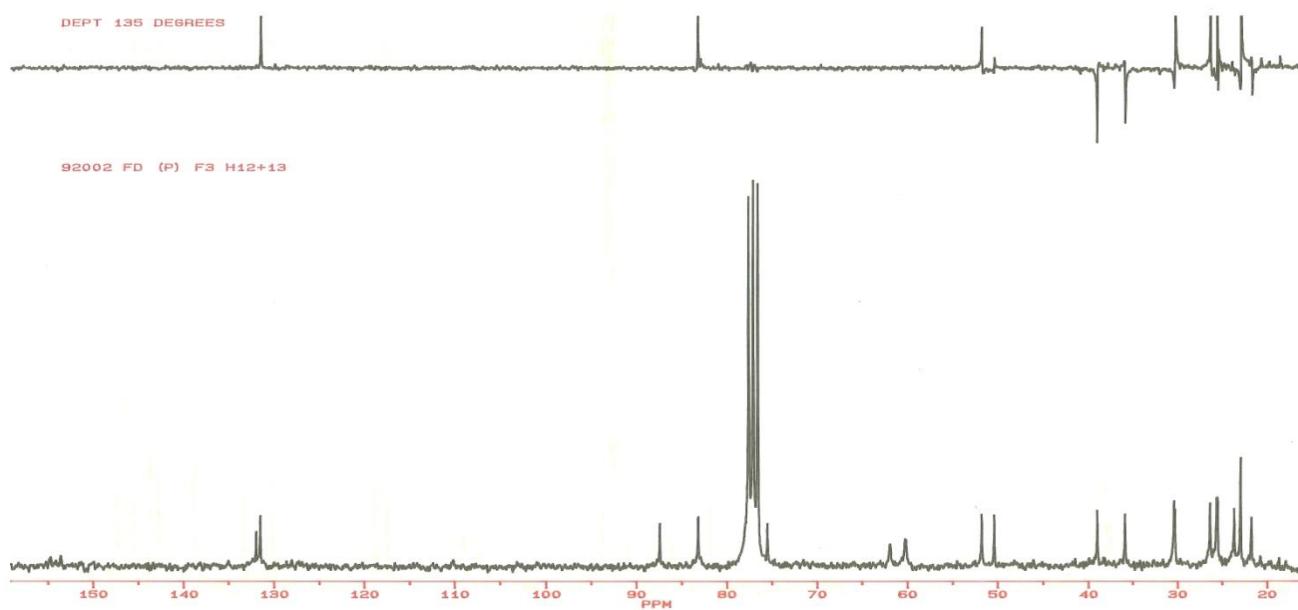


Figura 105. Espectros de RMN de ^{13}C y DEPT-135 (62.3 MHz, CDCl_3) del compuesto 17.

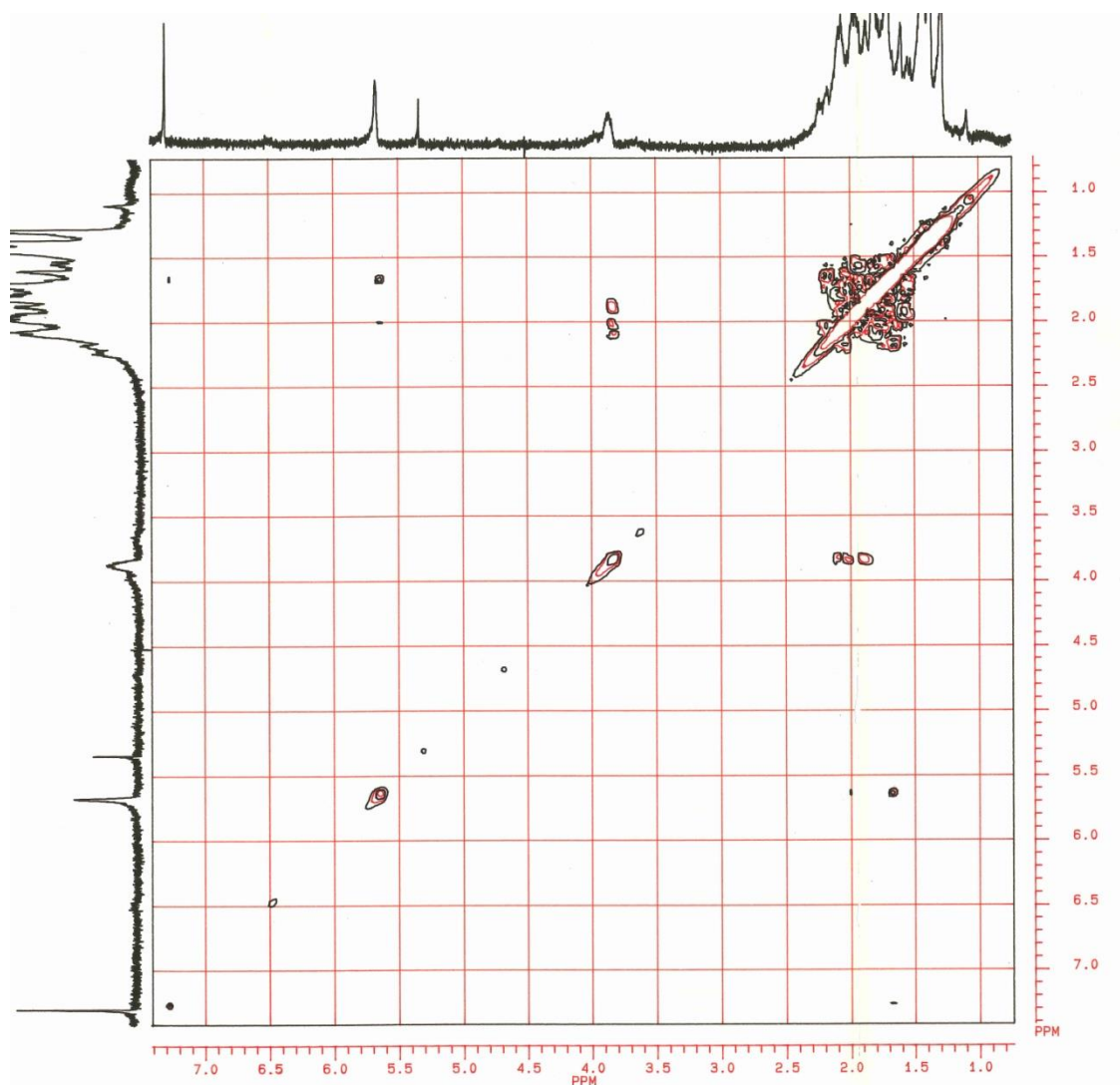


Figura 106. Espectro de RMN (250 MHz, CDCl_3) de ^1H - ^1H COSY del compuesto 17.

La confirmación de la estructura plana de **17** y la determinación de su estereoquímica relativa se realizó mediante un estudio de difracción de Rayos-X de uno de los cristales obtenidos en acetonitrilo. Dicho análisis mostró que la unión de los anillos A/B es *cis* (Figura 107) adoptando el anillo B una conformación silla mientras que el anillo A se dispone en una conformación semisilla debido a la presencia del doble enlace Δ^4 .

A partir de todos estos datos se pudo deducir que la estructura del compuesto **17** es la mostrada en la Figura 103, resultando un nuevo producto natural que se nombró como 6-hidroxikalihineno.

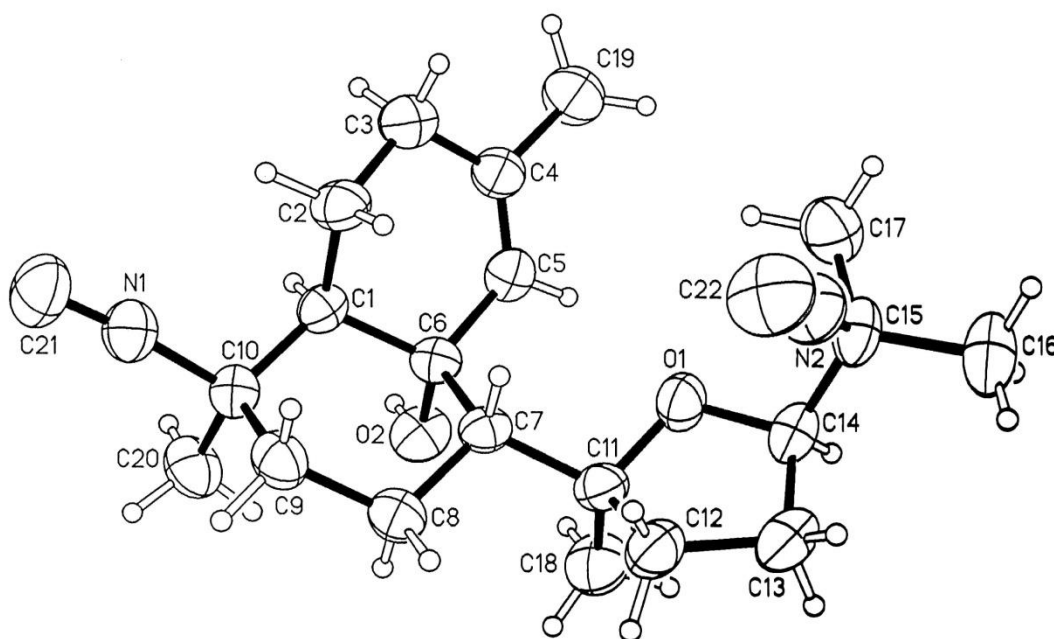
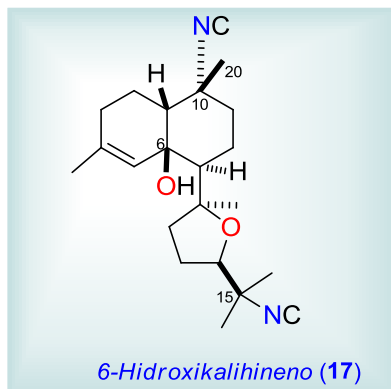


Figura 107. Diagrama ORTEP del 6-hidroxikalihineno (**17**) obtenido mediante el estudio de difracción de rayos X de monocristal.

Tabla 21 Datos de RMN de ^{13}C y ^1H (250 MHz, CDCl_3) del compuesto 6-hidroxikalihineno (17).


Posición	δ_{H} (ppm) mult. J (Hz)	δ_{C} (ppm) mult*
1		50.3 s
2/2'		21.7 t
3	2.00 m	30.3 t
4		131.9 s
5	5.62 1.2 Hz	131.4 d
6		75.4 s
7		51.6 d
8/8'		23.6 t
9		35.7 t
10		61.8 s
11	-	87.3 s
12/12'		38.9 t
13/13'		25.6 t
14	3.82 m	83.1 d
15		60.2 s
Me 16	1.33 t 1.6 Hz	26.3 c
Me 17	1.38 t 1.6 Hz	25.5 c
Me 18	1.24 s	22.9 c
Me 19	1.65 t 1.6 Hz	23.6 c
Me 20	1.76 sa	30.2 c
$-\text{N}^+\equiv\text{C}$		154.6, 153.5 s

*Multiplicidad deducida por experimentos DEPT-90 y DEPT-135.

II.3.1.4.5 6-Hidroxi-15-formamidokalihieno (18)

El compuesto **18** fue aislado de la fracción de HPLC **FDH5** (ver Esquema 10) como componente minoritario. Su fórmula molecular $C_{22}H_{34}N_2O_3$ fue deducida a partir del espectro de masas de alta resolución (+)-FABMS de su ion pseudomolecular $[M+Magic\ Bullet+H]^+$ a m/z 529.2778 ($C_{26}H_{45}N_2O_5S$, Δ 0.8 mmu).

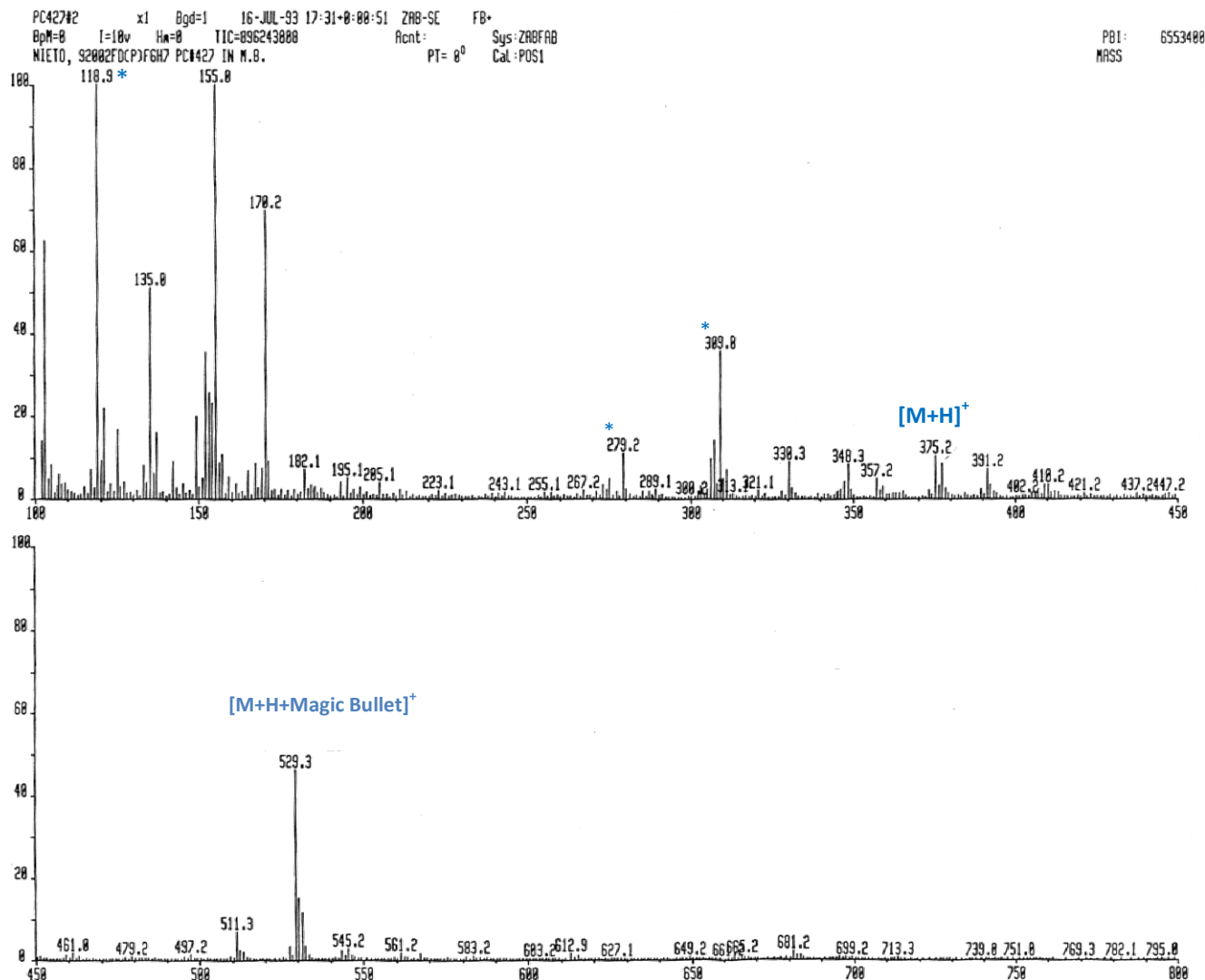


Figura 108. Espectro de (+)-FAB del compuesto **18** usando Magic Bullet como matriz.

La comparación de los desplazamientos químicos de RMN del compuesto **18** con los de los compuestos **15** y **17** sugirió que posee una estructura similar a la de **15** pero con un hidroxilo adicional unido a C6. Esto se confirmó a partir de la diferencia de 16 unidades de masa atómica entre los pesos moleculares de los compuestos **15** y **18** correspondientes a un átomo de oxígeno adicional. Además, la duplicación de las señales de los desplazamientos de los metilos Me16 y Me17 en el espectro de RMN de ^{13}C y los desplazamientos a δ_H 8.16 d $J = 12.6$ Hz y 8.6 d $J = 1.8$ Hz (proporción *trans/cis* 69:31 en $CDCl_3$) en el espectro de RMN de 1H de **18** confirman la presencia de un grupo formamido en C15. La localización del grupo isonitrilo sobre el carbono C10 se confirmó a partir del triplete de las señales del metilo Me20 con una constante de acoplamiento pequeña $^3J(^{15}N-^1H)$ en su espectro de 1H RMN debido al efecto de ese grupo funcional.

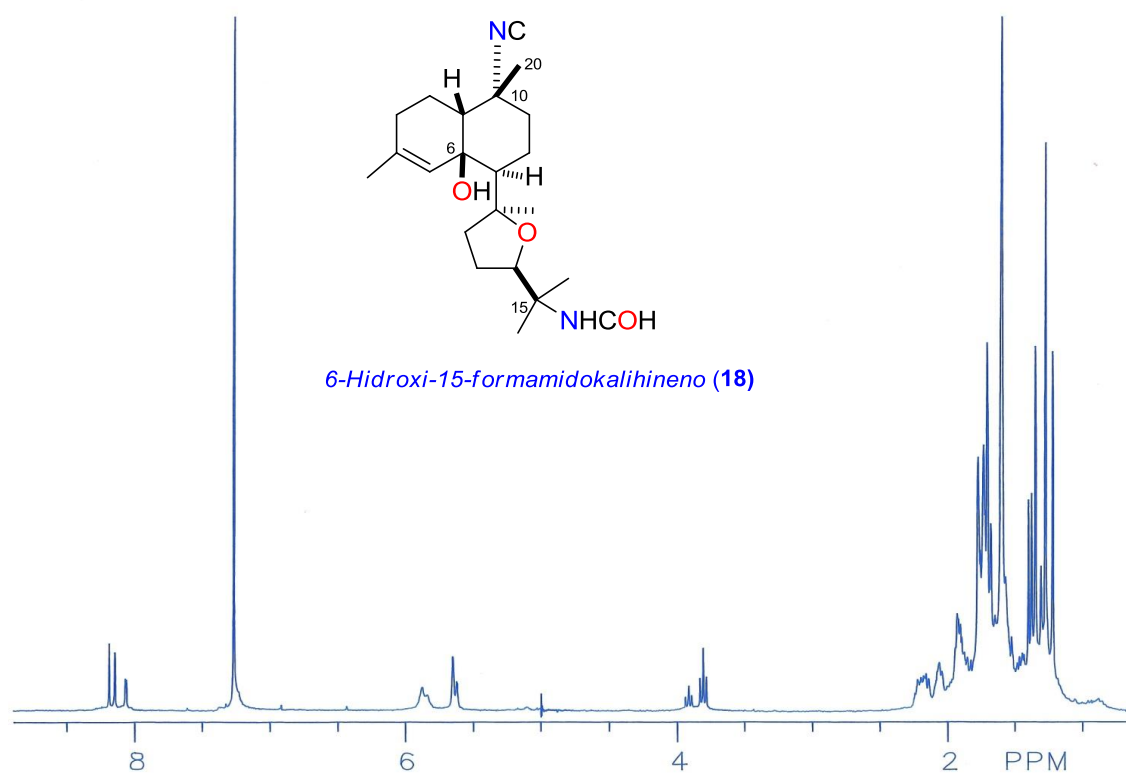


Figura 109. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **18**.

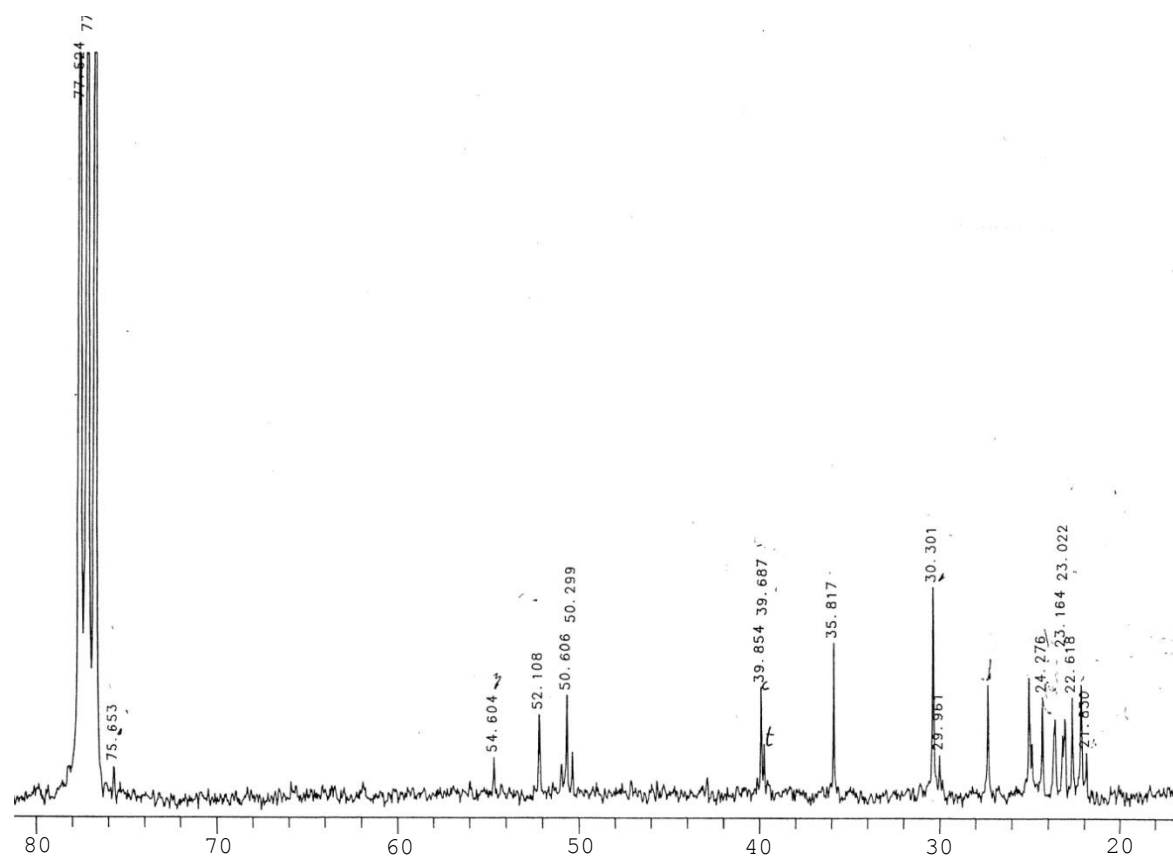
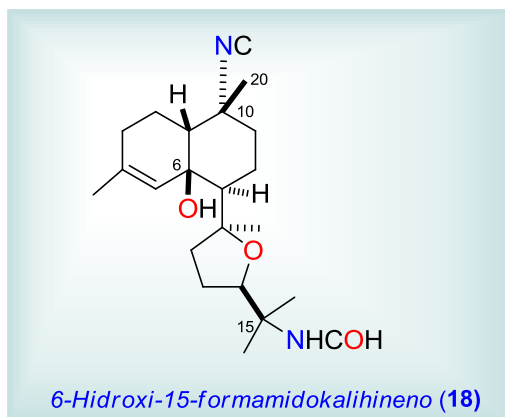


Figura 110. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **18**.

Con todos estos datos se propuso para el compuesto **18** la estructura mostrada en la Figura 109 resultando ser un nuevo producto natural al que se nombró como 6-hidroxi-10-formamidokalihiineno.

Tabla 22. Datos de RMN de ^{13}C y ^1H (300 MHz, CDCl_3) de los isómeros *cis/trans* del compuesto 6-hidroxi-15-formamidokalihiineno (**18**)



Posición	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz) <i>cis</i>	δ_{H} (ppm), mult. <i>J</i> (Hz) <i>trans</i>	δ_{C} (ppm) <i>cis</i>	δ_{C} (ppm) <i>trans</i>
1			50.3	50.6
2/2'			22.1	22.1
3			30.3	30.3
4			131.1	131.6
5	5.61 s	5.64 s	132.1	132.8
6			75.6	75.6
7			50.8	52.1
8/8'			23.6	23.6
9			35.8	35.8
10			63.0	63.0
11			86.9	86.9
12/12'			39.8	39.7
13/13'			25.0	25.0
14	3.91 t 7.2	3.80 t 7.2	84.5	84.3
15			54.6	-
Me 16	1.36 s	1.26 s	27.2	24.8
Me 17	1.39 s	1.34 s	24.3	21.8
Me 18	1.30 s	1.21 s	2.6	22.6
Me 19	1.59 sa	1.59 sa	23.0	23.0
Me 20	1.76 sa	1.72 sa	30.3	30.0
-COH	8.06 dd 1.8	8.16 d 12.6	163.3	160.9
-NH	5.87	5.84 dd, 12.3		

II.3.1.4.6 6-Hidroxi-10-formamidokalihinenol (19)

La fórmula molecular $C_{22}H_{35}N_2O_3$ del compuesto **19** fue establecida a partir del espectro de masas de alta resolución (+)-FABMS de su ion pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 375.2635 (Δ 1.2 mmu). El hecho de que posea la misma fórmula molecular que **18** indica que ambos compuestos deben de ser isómeros.

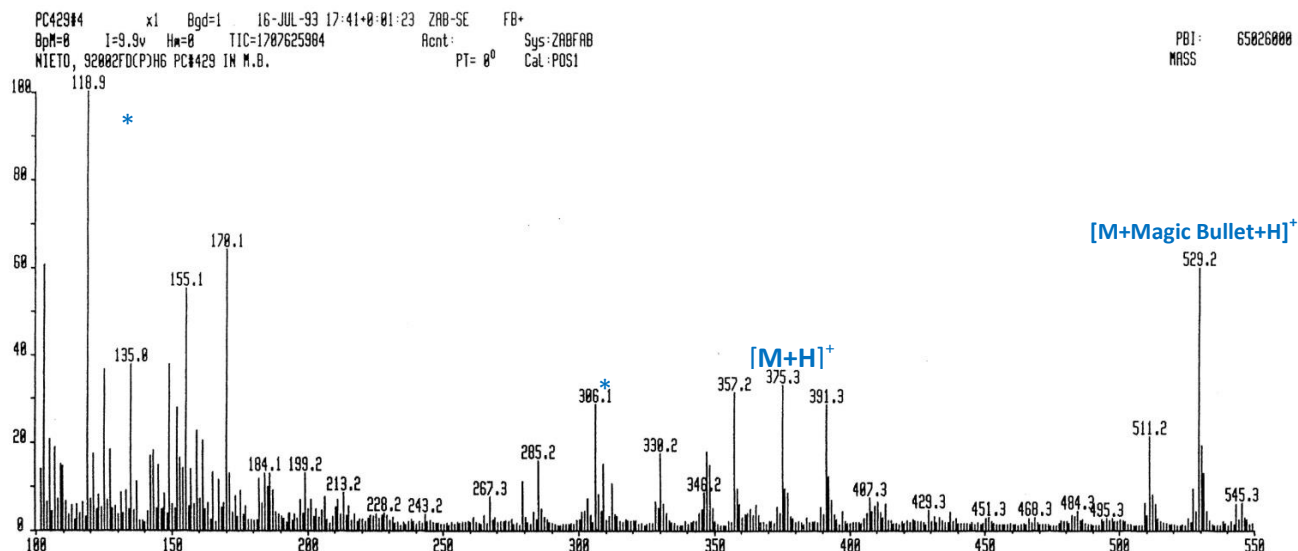


Figura 111. Espectro de masas (+)-FAB del compuesto **19** (matriz: Magic Bullet*).

La comparación de los datos espectroscópicos de RMN de **19** con los de los compuestos 6-hidroxi-10-formamidokalihinenol (**18**) y 10-formamidokalihinenol (**14**) sugirió que posee una estructura similar a la de **14** pero con un hidroxilo adicional unido a C6. De nuevo, la diferencia de 16 unidades entre los pesos moleculares de **14** y **19** correspondientes a un átomo de oxígeno confirma la presencia de un grupo hidroxilo adicional en **19**.

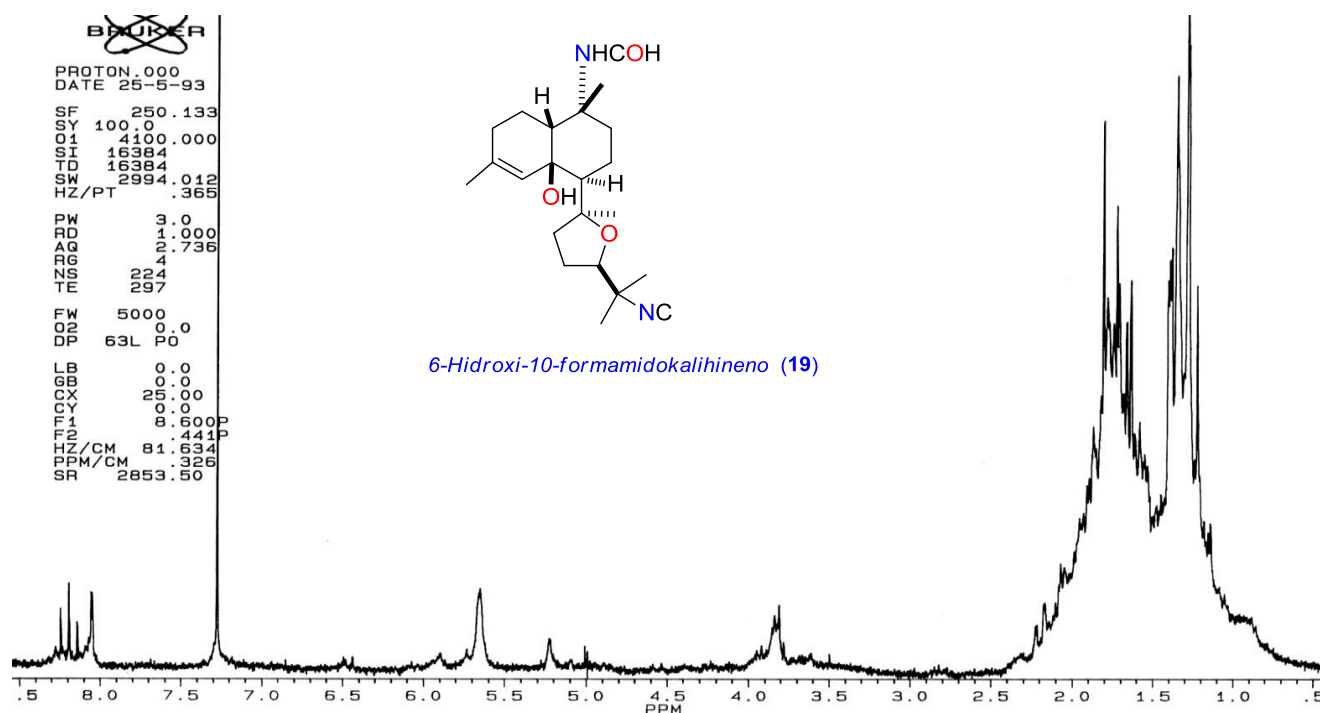


Figura 112. Espectro de RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$) del compuesto **19**.

La presencia de un grupo formamido se confirmó por las señales correspondientes a este grupo observadas en su RMN de ^1H (ver Tabla 23).

Tabla 23. Desplazamientos en el espectro RMN- ^1H del sustituyente formamido en el compuesto **19**

	19 cis	19 trans
CHO	$\delta 8.21, J = 12.0 \text{ Hz}$	$\delta 8.03, J = 2.0 \text{ Hz}$
NH	5.21 sa	5.70 sa

El espectro de IR del compuesto **19** (Figura 113) muestra las señales características del grupo formamido e isonitrilo a 1676 y 2131 cm^{-1} , respectivamente.

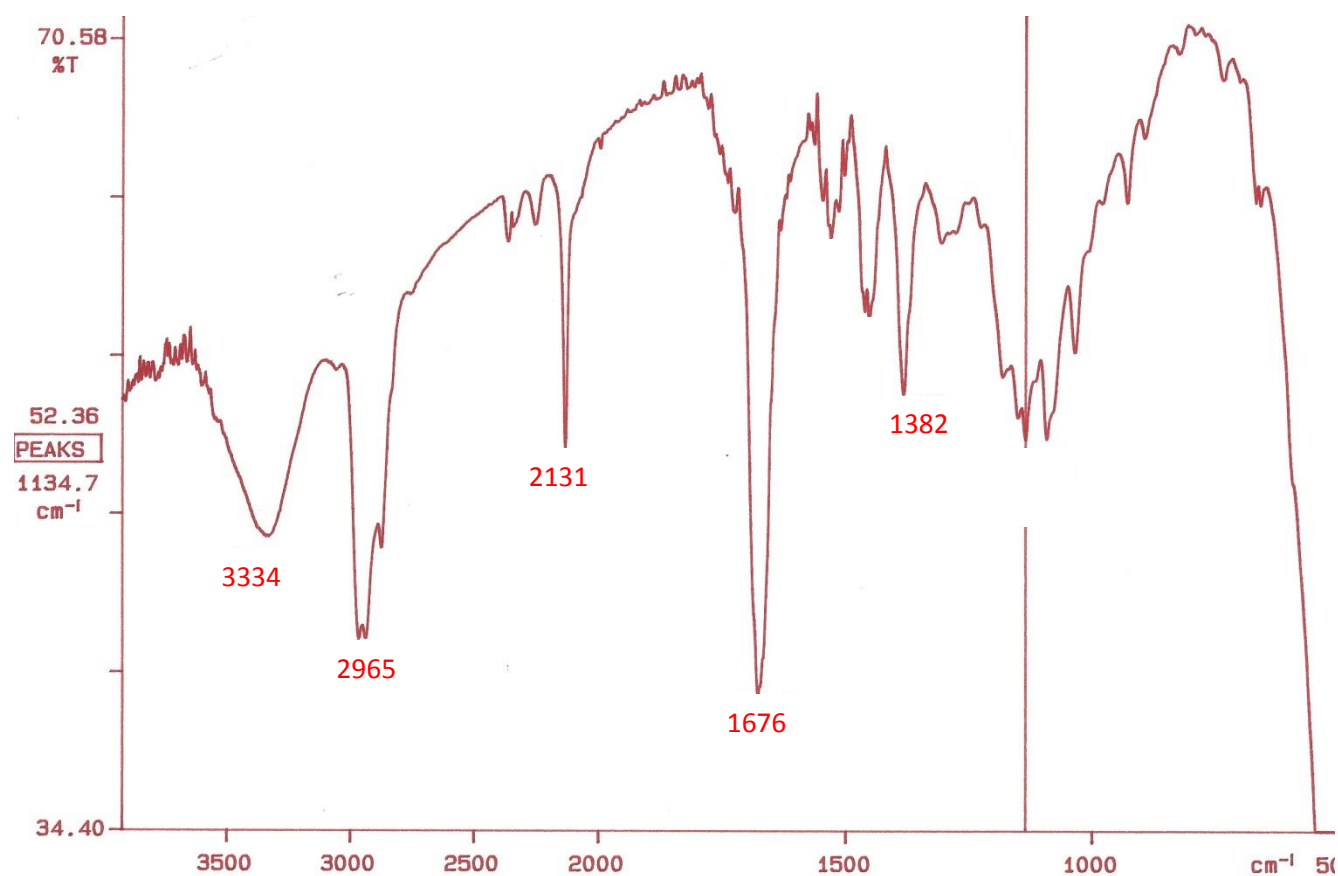
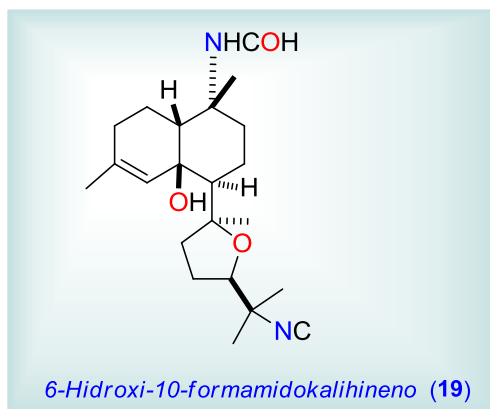


Figura 113. Espectro IR (KBr) del compuesto **19**.

A partir de estos datos se propone la estructura mostrada en la Figura 112 resultando ser un nuevo producto natural al que se le dio el nombre de 6-hidroxi-10-formamidokalihineno (**19**).

Tabla 24. Datos de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) de los isómeros *cis* y *trans* del compuesto **19**.



Posición	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz) <i>cis</i>	δ_{H} (ppm) mult. <i>J</i> (Hz) <i>trans</i>
1		
2/2'		
3		
4		
5	5.65 da	5.65 da
6		
7		
8/8'		
9		
10		
11		
12/12'		
13/13'		
14	3.82 m	3.82 m
15		
Me 16	1.27 sa	1.27 sa
Me 17	1.31 sa	1.31 sa
Me 18	1.21 s	1.21 s
Me 19	1.61 sa	1.61 sa
Me 20	1.82 s	1.70 s
-COH	8.21 d 12.0	8.03 d 2.0
-NH	5.21 sa	5.70 da

II.3.1.4.7 6-Hidroxi-10-formamido-15-isotiocianokalihinenol (20)

El espectro de masas de alta resolución (+)-FAB del compuesto **20** mostró el ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 407.2362 ($C_{22}H_{34}N_2O_3S_2$, Δ 0.6 mmu) que permitió determinar su fórmula molecular como $C_{22}H_{33}N_2O_3S_2$. La comparación de dicha fórmula molecular con la del compuesto **19** indica la existencia de un átomo adicional de S, sugiriendo que **20** debería de tener un grupo isotiocianato en vez de isonitrilo.

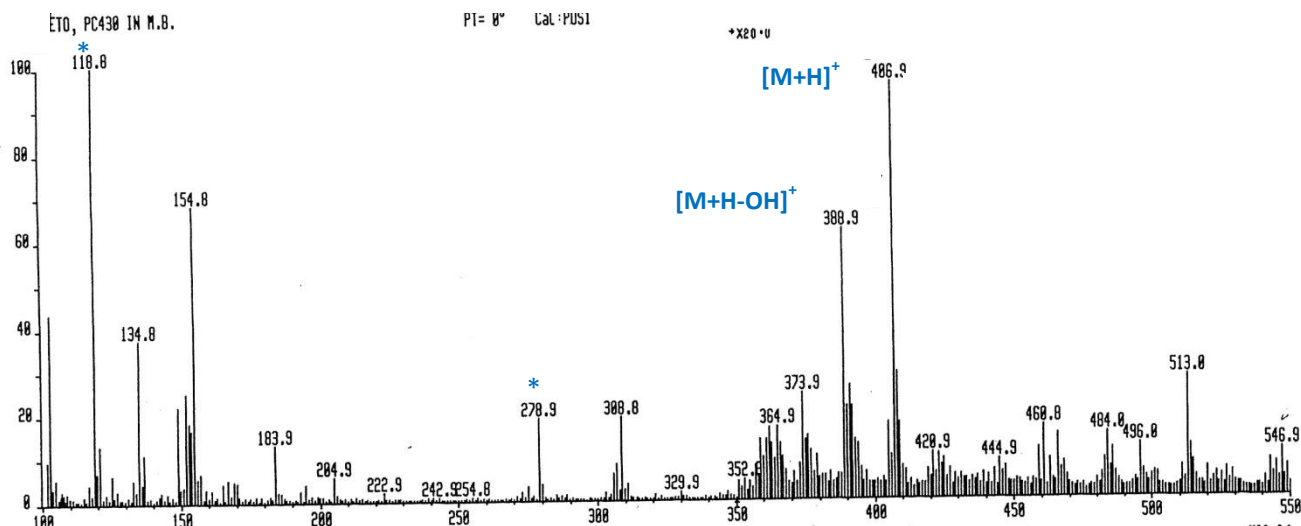


Figura 114. Espectro de masas (+)-FAB del compuesto **20** (matriz: Magic Bullet).

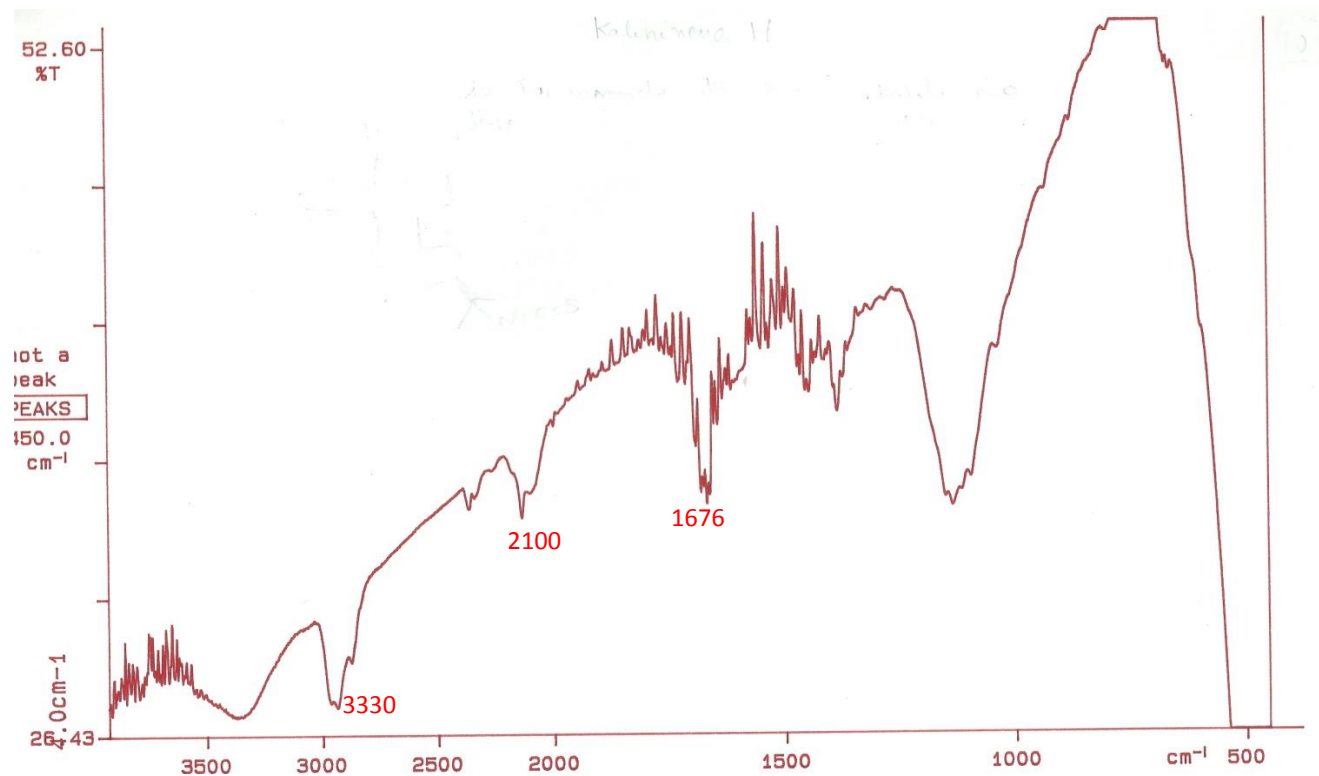
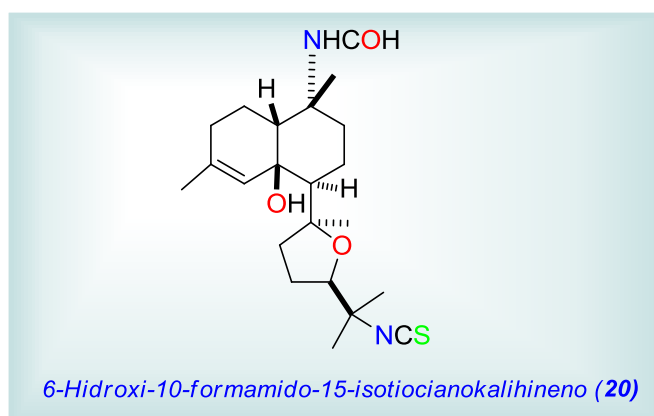


Figura 115. Espectro de IR del compuesto **20**.

En el espectro de IR del compuesto **20** se observan las señales 3330, 2100 y 1676 cm^{-1} que indican la presencia de los grupos hidroxilo, isotiocianato y formamido respectivamente.

El espectro de RMN ^1H de **20** mostró señales a δ_{H} 8.22 (d, $J = 12.5$ Hz) y 8.05 (d, $J = 1.8$ Hz) que indicaron que la proporción de los isómeros *trans/cis* debido al grupo formamido era 42:58. La comparación de sus datos de RMN con los de los compuestos **17**, **18**, y **19** nos permitieron deducir la localización del grupo hidroxilo en el carbono C6, el grupo funcional NHCHO en el carbono C10 y el grupo isotiocianato NCS en el carbono C15. Su estereoquímica relativa fue asignada por analogía con el compuesto **16**.

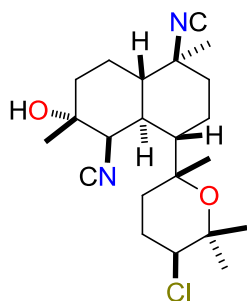
Tabla 25. Datos del espectro RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) del compuesto **20**.



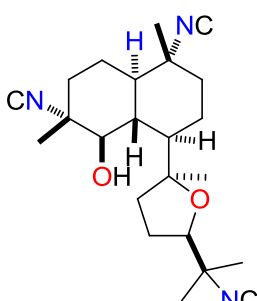
Posición	δ_{H} (ppm) mult. J (Hz) <i>cis</i>	δ_{H} (ppm) mult. J (Hz) <i>trans</i>
1		
2/2'		
3		
4		
5	5.63 s	5.63 s
6		
7		
8/8'		
9		
10		
11		
12/12'		
13/13'		
14	3.82 dd 8.5, 4.3	3.82 dd 8.5, 4.3
15		
Me 16	1.35 sa	1.35 sa
Me 17	1.41 sa	1.41 sa
Me 18	1.27 sa	1.27 sa
Me 19	1.60 sa	1.60 sa
Me 20	1.61 s	1.61 s
-COH	8.22 d 12.5	8.05 d 1.8
-NH	5.21 sa	5.70 da

II.3.1.4.8 Otros compuestos aislados

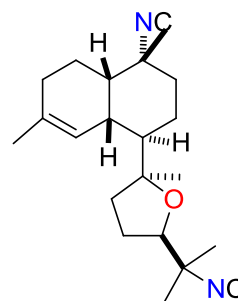
Adicionalmente se aislaron otros tres compuestos que por comparación con los datos que aparecen en la bibliografía se identificaron como kalihinol A (**21**), isokalihinol A (**22**) y kalihineno (**23**).^{374,375,376}



Kalihinol A (21)



Isokalihinol F (22)

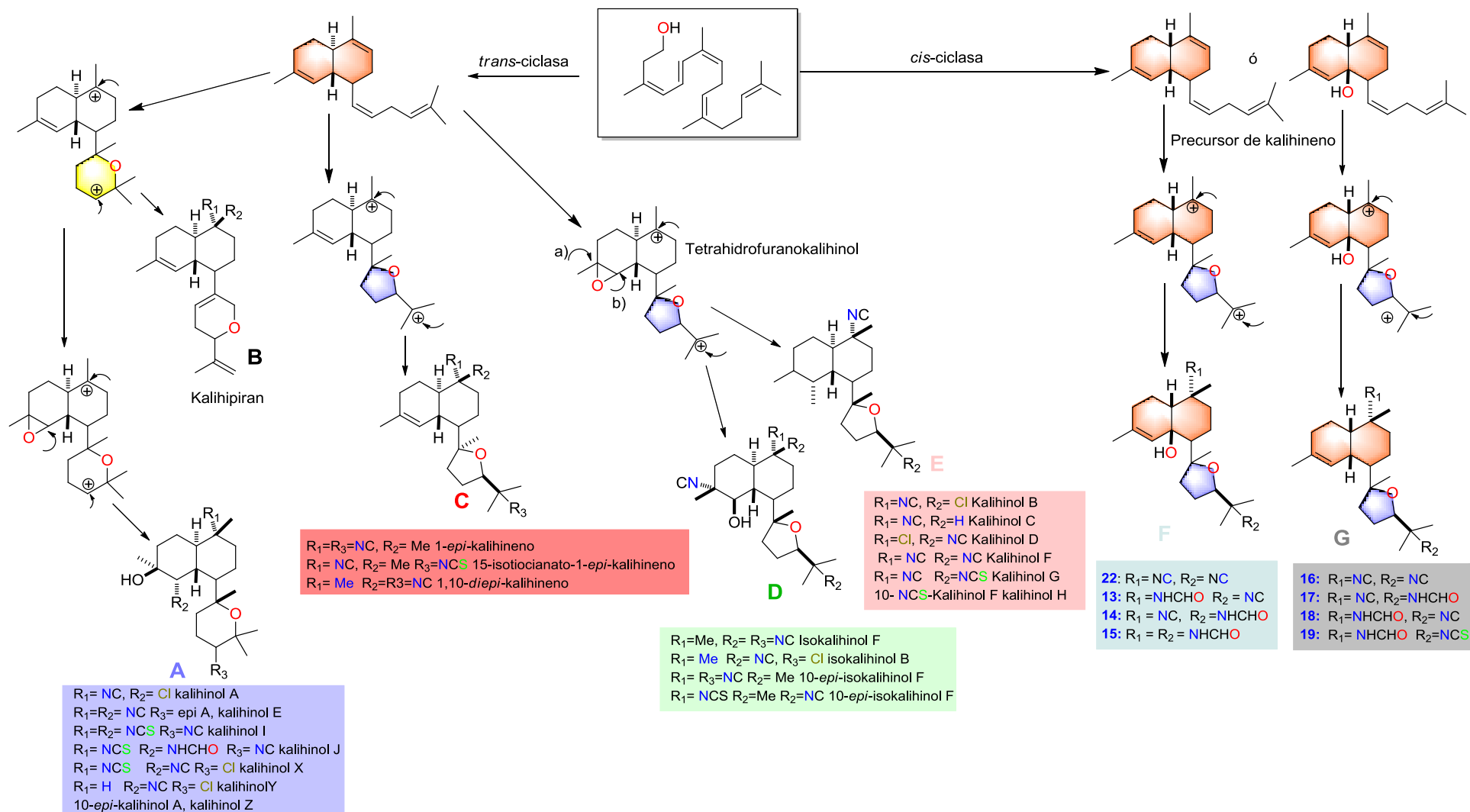


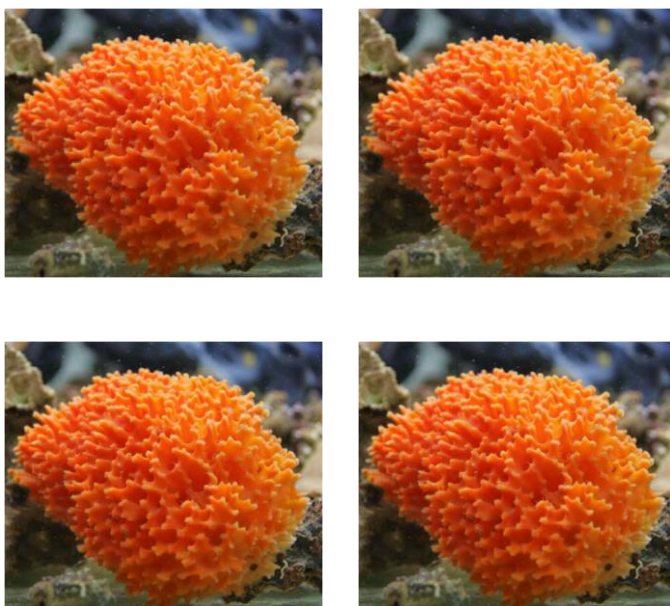
Kalihineno (23)

II.3.1.4.9 Esquema biogenético

Teniendo en cuenta las estructuras de todos los compuestos aislados y basándose en la propuesta biogenética anteriormente postulada por Fenical para otros compuestos similares,³⁷⁷ se propuso la ruta biogenética mostrada en el Esquema 11.

³⁷⁷ Shin J. H., Fenical W., Stout T. J., Clardy J. *Tetrahedron* **1993**, 49, 515.





II.3.2 Estudio químico individual de especímenes de la esponja *A. cavernosa* cultivados en laboratorio

II.3.2 Estudio químico individual de especímenes de *Acanthella cavernosa* cultivados en laboratorio

II.3.2.1 Recolección y cultivo en laboratorio: protocolos utilizados

En la misma expedición de noviembre de 1992 se recolectaron además 109 especímenes de *Acanthella cavernosa* en las Islas Fiyi (Oceanía) del Océano Pacífico. Las esponjas se transportaron vivas al laboratorio de acuicultura CalBioMarine Technologies en Carlsbad, (California, EEUU) donde se mantuvieron en el sistema de acuicultura durante siete meses antes de su extracción.

La identificación taxonómica de estas esponjas fue realizada por el Dr. R. W. M. van Soest del Instituto Taxonómico de Zoología de la Universidad de Amsterdam.

Las esponjas se mantuvieron vivas en tanques de agua salada. Antes de que fueran transportadas a Los Angeles, se hiperoxigenaron y se bajó la temperatura del agua para mantenerlas en buen estado durante el viaje. Posteriormente se introdujeron en unos botes de PVC con agua de mar.

A pesar de todas estas precauciones, cuando llegaron al laboratorio de CalBiomarine en Los Angeles, las esponjas tenían una concentración de oxígeno cercana a cero por lo que se habían deteriorado ligeramente. Se trasvasaron a un tanque donde se aclimataron, controlando la temperatura del agua. Con el fin de que se recuperaran, se hiperoxigenaron y se limpiaron de bacterias y algas con un cepillo. Variando la temperatura del agua, se consiguió controlar la presencia de hongos y después de veintiún días, se comenzó una alimentación compuesta de microalgas vivas y bacterias liofilizadas. Se mantuvieron en ese acuario durante siete meses antes de su extracción.

Después de aclimatar las esponjas que sobrevivieron, se dividieron al azar en varios grupos que fueron sometidos a diferentes protocolos con el fin de determinar la influencia de distintos factores en el crecimiento de la esponja y en la producción de los metabolitos:

Protocolo 1: Exposición a la luz intensa y daño en el tejido celular.

Estas esponjas se denominaron *Inicial*, *Luz* y *Daño*.

Protocolo 2: Exprimir las esponjas.

Se nombraron como *Exprimidas* y *Control 1*.

Protocolo 3: Tratamiento con *Luz intensa* y *ausencia total de luz*.

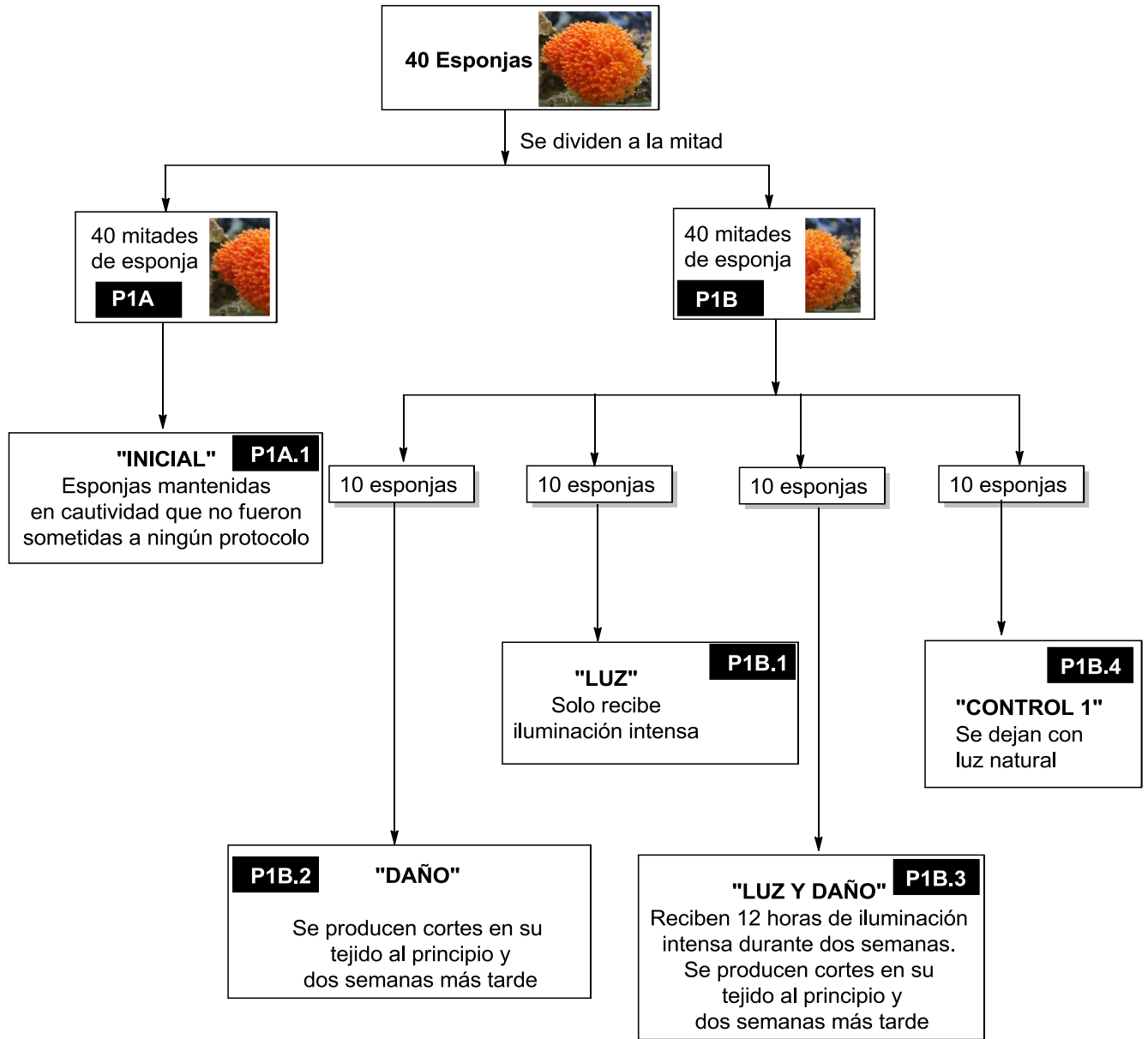
Se denominaron a estas esponjas *Luz* y *Control 2*.

Protocolo 4: Inducción química.

Se nombraron como esponjas *Blanco* e *Inductor químico*.

En los Esquemas 12 y 13 se muestra como se distribuyeron las esponjas en grupos y el protocolo correspondiente al que se sometieron.

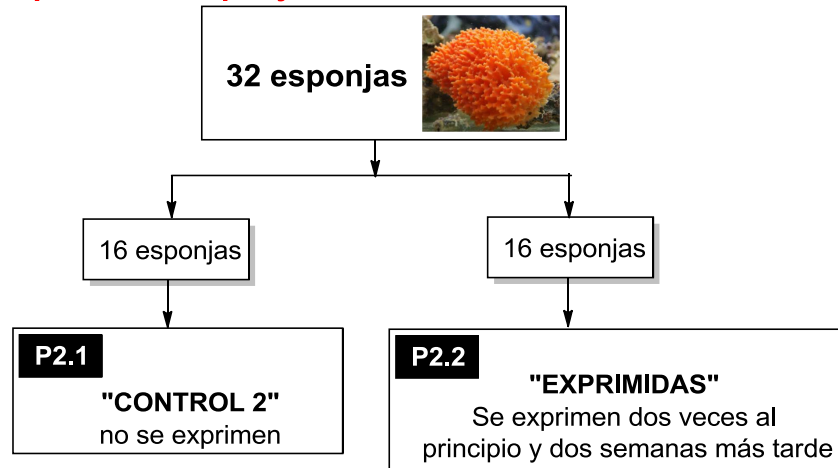
Protocolo 1: (P1) Luz intensa y daño en el tejido de la esponja



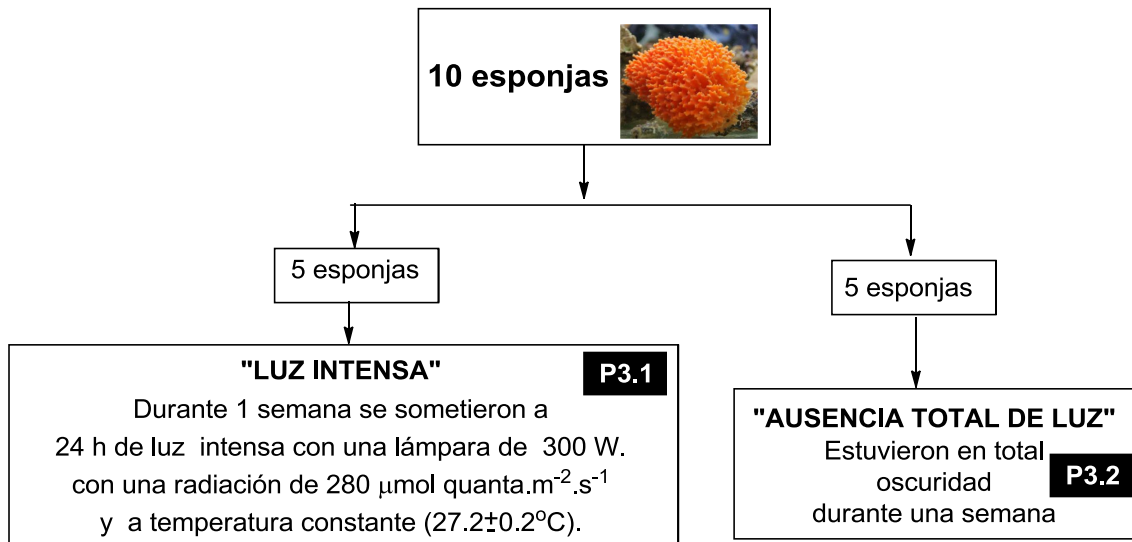
Esquema 12. Protocolo 1 aplicado a 40 especímenes de esponja *A. cavernosa*

Al terminar los experimentos, todos los organismos fueron fotografiados y clasificados antes de su estudio químico.

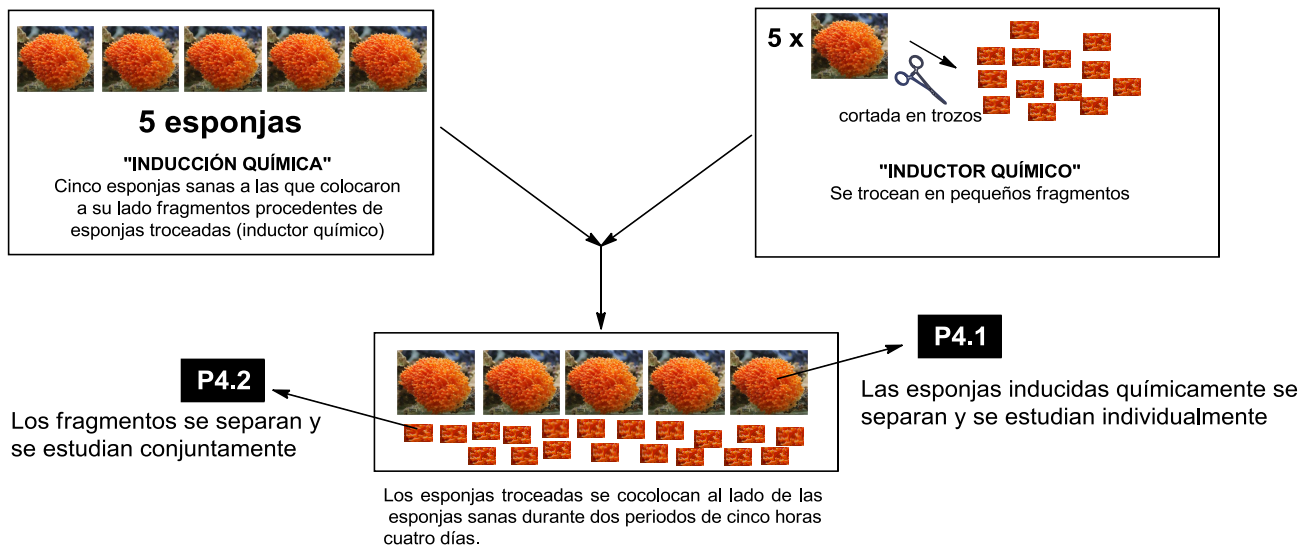
Protocolo 2: (P2) Exprimir las esponjas



Protocolo 3: (P3) Tratamiento de luz intensa



Protocolo 4: (P4) Inducción química



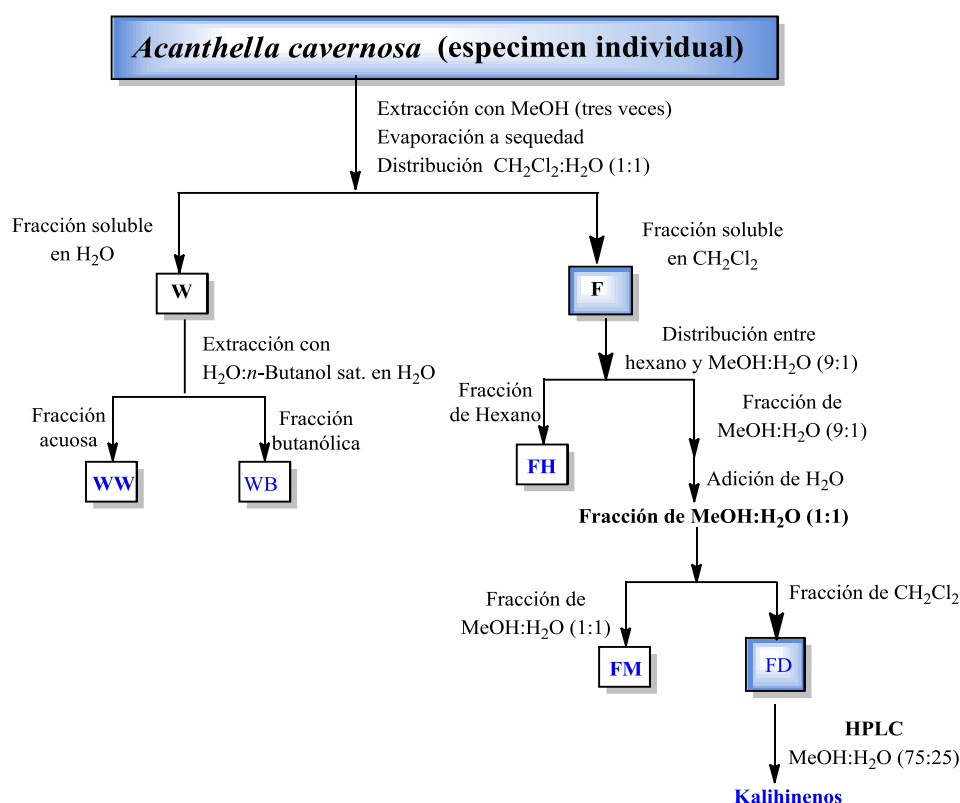
Esquema 13. Protocolos 2-4 aplicados a diferentes grupos de especímenes individuales de *Acanthella cavernosa*

II.3.2.2 Evaluación de la producción de los kalihinenos en esponjas cultivadas bajo diferentes condiciones

II.3.2.2.1 Estudio químico de las esponjas individuales

Después del estudio químico del conjunto de especímenes de *A. cavernosa* que supuso el aislamiento, determinación de las estructuras de los nuevos kalihinenos, se continuó con el estudio de los especímenes individuales cultivados durante siete meses en los laboratorios de CalBiomarine Inc. en Carlsbad California en un sistema diseñado para cultivo de esponjas Aqua-Farm System II.TM Durante este tiempo se las sometió a los diferentes protocolos expuestos en los Esquemas 12 y 13, para comprobar si sería posible alterar y aumentar la cantidad de kalihinenos producida por la esponja *A. cavernosa* en estado salvaje. Después de los siete meses, las esponjas fueron enviadas a la Universidad de California Santa Cruz al grupo de investigación del Profesor Philip Crews donde se realizó el estudio químico.

Cada uno de los especímenes fue extraído siguiendo el esquema de fraccionamiento descrito en el Esquema 14.



Esquema 14. Esquema de fraccionamiento de los especímenes individuales de acuicultura de la esponja *A. cavernosa*

Primero se estudiaron 15 especímenes individuales de *A. cavernosa* cultivadas durante siete meses en el laboratorio de la empresa californiana CalBiomarine Technologies pero que no fueron sometidas a protocolos. De forma individual y en todas ellas se obtuvo la fracción **FD**, a partir de la cual se desarrolló un método analítico de separación y cuantificación mediante HPLC.

En las primeras inyecciones se utilizó una columna analítica de gel de sílice C18 (Regis 250 x 4.6 mm, tamaño de poro 300 Å y 5µm de tamaño de partícula) con las mismas características que la semipreparativa para la purificación de los extractos. Se utilizó como eluyente una mezcla de MeOH y H₂O en proporción 75:25, y los cromatogramas de HPLC fueron analizados utilizando un detector de índice de refracción con el software de

cromatografía de HPLC EZChrome®. Para la obtención de las rectas de calibrado de los compuestos se realizaron cinco inyecciones para cada uno de los compuestos a cuantificar.

Después de realizar varias inyecciones de las fracciones **FD** se observó un deterioro significativo de la columna de HPLC, impidiendo la obtención de picos estrechos y perdiendo capacidad de separación. Para evitar este problema se sustituyó la columna anterior por una columna analítica Regis SemiPermeable Surface (SPS) 5 μ m, de sílica esférica unida con C8 (250 x 4.6 mm) y usando como eluyente MeOH:H₂O (60:40). Esta columna tiene dos fases, una externa que excluye moléculas grandes y otra interna, típica de fase reversa, que permitió resolver los problemas encontrados.

Se rehicieron las rectas de calibrado para cada compuesto y se inyectaron las diez fracciones **FD** de cada uno de los especímenes individuales (línea base) para determinar los tiempos de retención de los kalihinenos. Todas las esponjas mostraron una composición similar, presentando la misma relación de compuestos que los obtenidos de los especímenes procedentes de su hábitat natural. Los kalihinenos mayoritarios, mostrados en el cromatograma de la Figura 116, fueron isokalihinol F (**22**), 10,15-bisformamidokalihineno (**16**), 6-hidroxikalihineno (**17**), 15-formamidokalihineno (**14**), kalihinol A (**21**), 15-formamidokalihineno (**15**) y kalihineno (**23**).

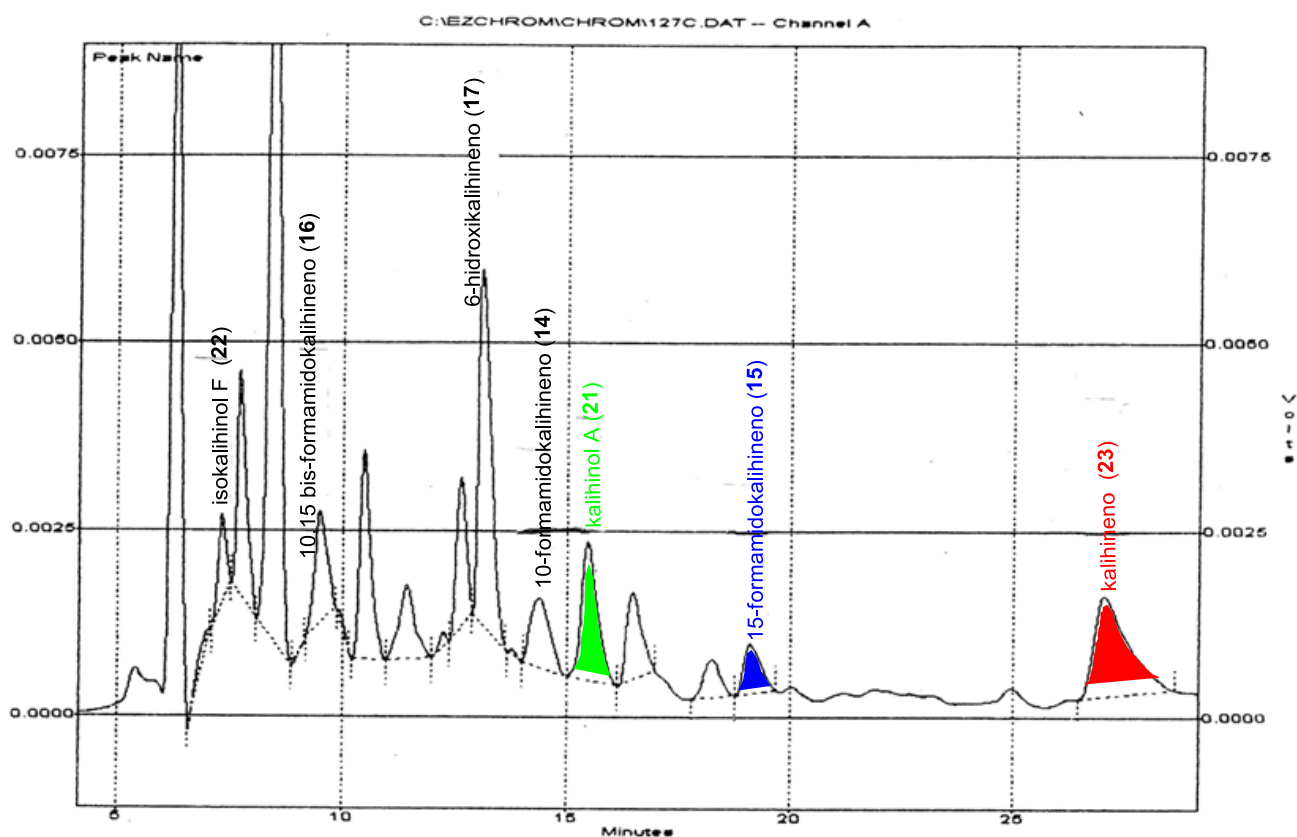


Figura 116. Cromatograma típico de la separación en HPLC de la fracción de diclorometano **FD** de las esponjas procedentes de su medio natural. Detección: índice de refracción.

Para ver la variación de la producción kalihinenos en todas las esponjas, el estudio se centró sólo en tres de los kalihinenos mayoritarios, **15**, **21** y **23**, que aparecen sombreados en el cromatograma de la Figura 116. El porcentaje de cada compuesto se determinó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$\% \text{ compuesto} = \frac{(\text{mg. compuesto detectado}) \times (\text{g FD})}{(\text{g FD inyectado}) \times (\text{g peso seco esponja})} \times 100\%$$

A partir de las curvas de calibración se lograron determinar las mínimas cantidades detectables para cada compuesto que fueron: 0.002 mg para 15-formamidokalihineno (**15**), 0.0006 mg para el kalihinol A (**21**) y 0.10 mg para el kalihineno (**23**). A continuación, las esponjas tratadas con los diferentes protocolos se extrajeron y fraccionaron obteniéndose las correspondientes fracciones de diclorometano **FD** que fueron seguidamente inyectadas en HPLC usando las condiciones anteriormente descritas

II.3.2.2.2 Efectos de los protocolos en la producción de kalihineno en las esponjas cultivadas

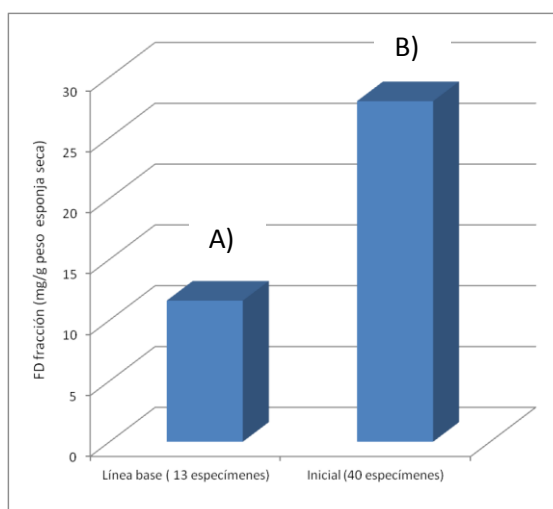
Con el fin de determinar la influencia de los distintos protocolos aplicados a las esponjas cultivadas, se compararon las variaciones de diferentes pesos (FD, kalihineno, contenido proteico, etc.) como se verá a continuación.

a. Variación en peso de la fracción FD en especímenes no sometidos a ningún protocolo

Para cada espécimen se calculó en primer lugar el peso relativo de su correspondiente fracción FD según la ecuación 2. A continuación se compararon los pesos relativos de fracción **FD** de los especímenes recolectados en su hábitat natural (13 especímenes que hemos denominado *línea base*), con las medias obtenidas de los que fueron cultivados en el laboratorio durante siete meses sin haberlos sometido a ningún protocolo (40 especímenes que hemos denominado *inicial*).

Ecuación 2

$$\text{Peso relativo de FD (esp. seca)} = \frac{\text{Peso de FD (mg)}}{\text{Peso de esponja seca después de extracción (g)}}$$



Gráfica 1. Comparación de los pesos relativos de la fracción **FD**: A) De 13 especímenes en su hábitat natural (línea base). B) De 40 especímenes crecidos en acuicultura sin ser sometidos a ningún protocolo (Inicial).

Tal como se representa en la Gráfica 1 se puede observar que se produce un incremento en el peso de dicha fracción **FD** por gramo de esponja seca.

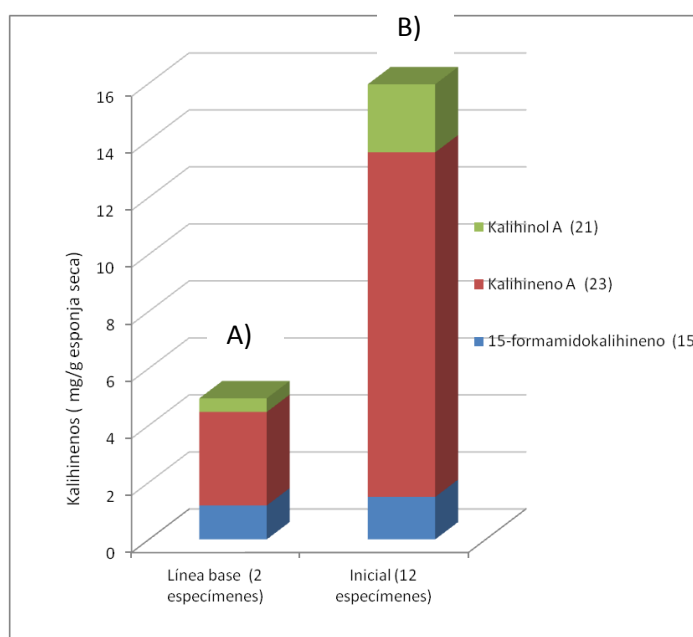
b. Variación del peso de los kalihinenos en especímenes no sometidos a ningún protocolo

De forma similar, se calculó el peso relativo de los kalihinenos, kalihinol A (**21**), kalihineno A (**23**) y 15-formamidokalihineno (**15**), según la ecuación 3.

Ecuación 3

$$\text{Peso relativo de kalihinenos} = \frac{\text{Peso de 15, 21 y 23 (mg)}}{\text{Peso de esponja seca después de extracción (g)}}$$

A continuación se compararon las medias de los pesos relativos de compuestos provenientes de dos especímenes de la línea base (esponjas procedentes de su hábitat natural) frente a la media de las mismas relaciones de kalihinenos procedente de doce especímenes de acuicultura que no fueron sometidos a ningún protocolo.



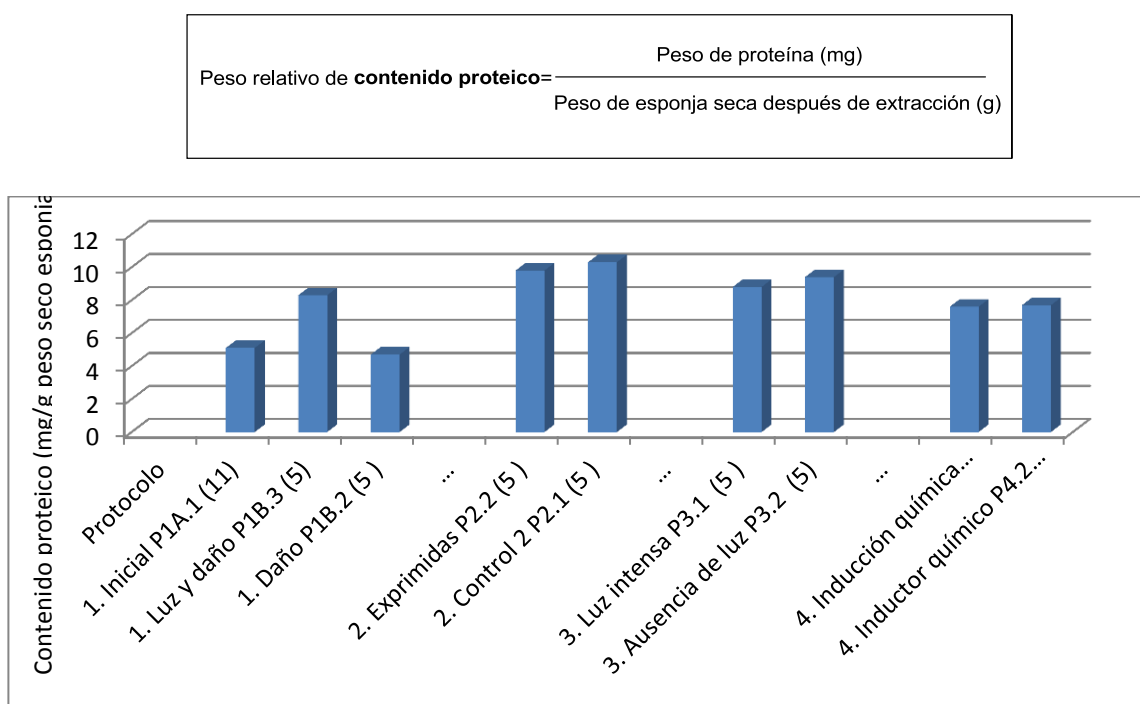
Gráfica 2. . Medias de los pesos de los kalihinenos con respecto al peso de la esponja seca: A) de dos especímenes en su hábitat natural (línea base). B) De 12 especímenes crecidos en acuicultura sin ser sometidos a ningún protocolo (Inicial).

Como se observa en la Gráfica 2 también hay un aumento del peso relativo de los pesos relativos de los kalihinenos mayoritarios. De las gráficas 1 y 2 se puede deducir que hay tanto un aumento de la cantidad de fracción **FD** como de kalihinenos. Sin embargo este aumento se podría explicar debido a que existe un deterioro del esqueleto espicular de la esponja que implicaría una pérdida de peso de la esponja seca, y por lo tanto un aumento de dicho peso relativo. Para eliminar esta incertidumbre, se decidió referir tanto el peso de la fracción **FD** como el de los kalihinoles *al contenido proteico procedente del material celular* de cada esponja en vez de al peso seco de la esponja extraída. Se presupone que a mayor material proteico mayor debería ser la producción de kalihinenos en la esponja.

c. Variación del contenido proteico en especímenes no sometidos a ningún protocolo

Para observar el efecto de los diferentes protocolos aplicados a las esponjas, se midió el efecto en la producción del material celular y por lo tanto del contenido proteico con respecto al peso seco de esponja. Con este fin se midió la cantidad total de proteína en cada esponja utilizando el método Bradford con la globulina gamma-bovina como estándar de cuantificación.³⁷⁸ Este control nos podría dar una idea en la producción de kalihinenos con todos los tratamientos. En la Gráfica 3 se observa la media del contenido de proteico con respecto a esponja seca, según la Ecuación 4, de cada grupo de esponjas tratadas con los protocolos 1, 2, 3 y 4 (ver Esquemas 12 y 13).

Ecuación 4



Gráfica 3. Peso medio de contenido proteico de los especímenes de acuicultura sometidos a los diferentes protocolos aplicados. Notación en el eje x: Protocolo. Tipo de tratamiento (Número de esponjas analizadas) Ver Esquemas 12 y 13.

Como se puede observar en la gráfica, el contenido proteico de las esponjas después de someterlas a los diferentes protocolos aumenta en relación al observado en las esponjas iniciales, especímenes del hábitat natural.

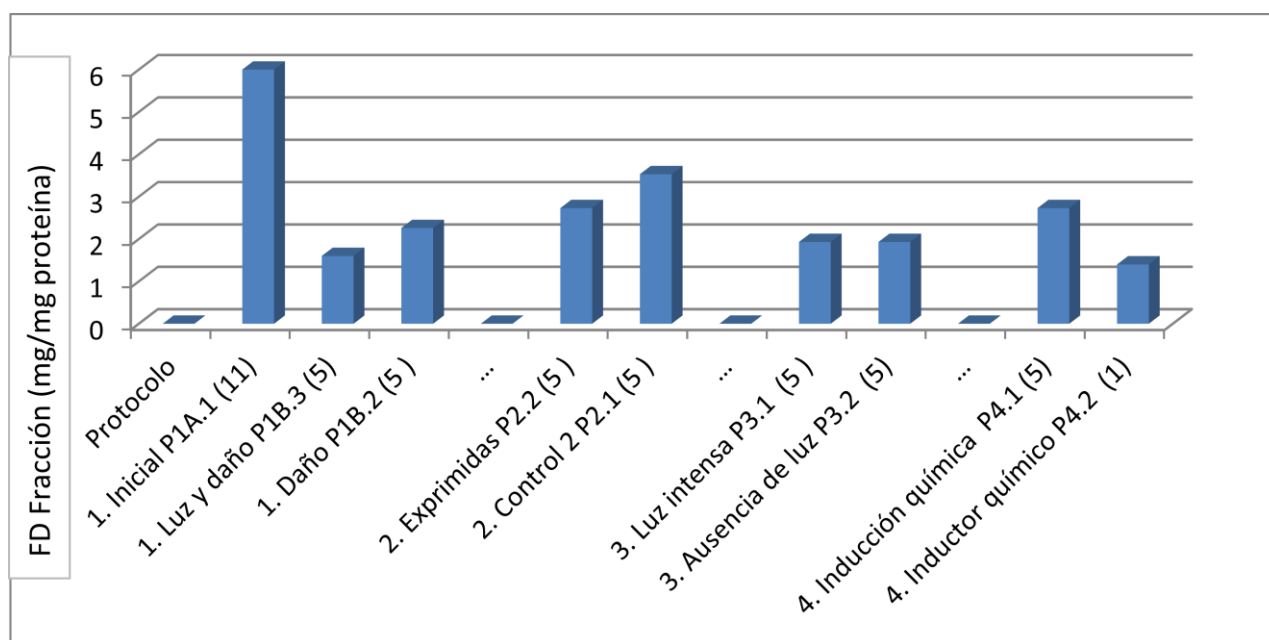
d. Variación en peso de la fracción FD en especímenes sometidos a diferentes protocolos

Se calculó entonces la media de la relación del peso de fracción **FD** con respecto al contenido proteico para cada grupo de esponjas sometidas a los protocolos 1, 2, 3 y 4 descritos en los Esquemas 12 y 13 y según la ecuación 5:

Ecuación 5

$$\text{Peso relativo de FD (cont. proteico)} = \frac{\text{Peso de FD (mg)}}{\text{Peso de contenido proteico (mg)}}$$

³⁷⁸ Bradford M. *Anal. Chem.* **1976**, 72, 248.



Gráfica 4. Medias de peso de la fracción **FD** con respecto al contenido protéico de especímenes de acuicultura sometidos a diferentes protocolos. Notación en el eje x: Protocolo. Tipo de tratamiento (Número de esponjas analizadas). Ver Esquemas 12 y 13.

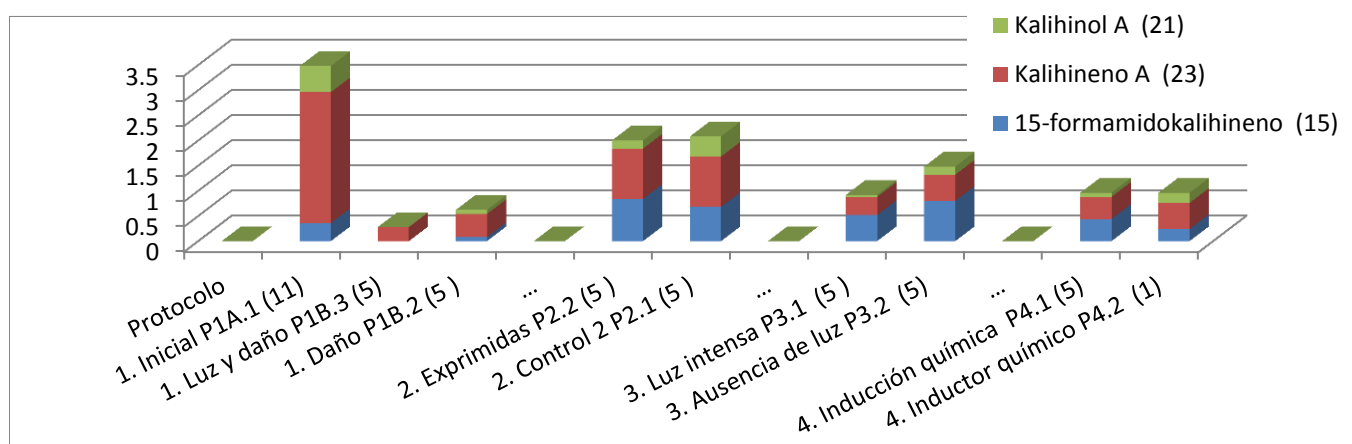
Tal como se observa en la Gráfica 4, hay una disminución clara de peso relativo de **FD** con respecto al contenido proteico con la aplicación de los protocolos 1, 2, 3 y 4.

e. Variación de kalihinenos en especímenes tratados con diferentes protocolos

Posteriormente se calculó la variación en la media de la relación de peso de kalihinenos con respecto al contenido proteico en los diferentes protocolos aplicados a los grupos de esponjas según la ecuación 6. Estos resultados se pueden observar en la siguiente Gráfica 5.

Ecuación 6

$$\text{Peso relativo de kalihinoles} = \frac{\text{Peso de 15, 21 y 23 (mg)}}{\text{Peso de contenido proteico (mg)}}$$



Gráfica 5. Media del peso de kalihinenos con respecto al contenido proteico en especímenes sometidos a los protocolos 1-4. Notación en el eje x: Protocolo: Tipo de tratamiento y número de esponjas tratadas. Ver Esquemas 12 y 13.

La Gráfica 5 indica claramente una disminución de la producción de kalihinenos con respecto al contenido protéico después del tratamiento de todos los protocolos.

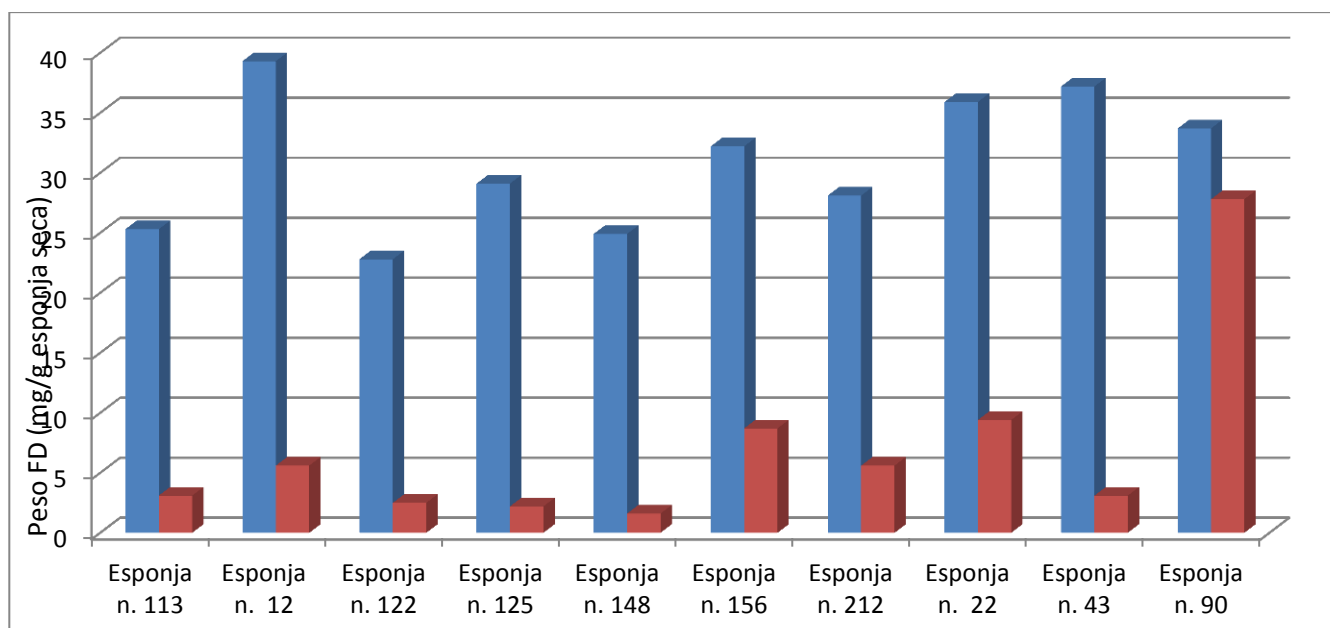
Podemos concluir por tanto a partir de estas comparaciones que a pesar de que hay un aumento del contenido proteica en las esponjas tratadas, la maquinaria biogenética de las esponjas tratadas no produce más kalihinenos. Para los experimentos P1, P3 y P4, los rendimientos químicos de kalihinenos muestran una clara tendencia a la baja.

f. Variación del peso de FD entre pares de especímenes tratados con diferente protocolos.

En las gráficas 6-8 se representan con las columnas azules las esponjas sin tratar y las rojas después del tratamiento con los distintos protocolos.

En la Gráfica 6 se representan en las barras azules las esponjas sometidas al protocolo **P1A.1** (Esquema 10, mitades de las esponjas 113A, 12A, 122A, 125A, 148A, 156A, 212A, 22A, 43A, 90A que se cultivaron siete meses en el laboratorio), frente a las otras 10 mitades de esponjas del protocolo **P1B.4** (113B, 12B, 122B, 125B, 148B, 156B, 212B, 22B, 43B, 90B) representadas en barras rojas. Este segundo grupo de esponjas se dejaron en el acuario un mes más, observándose claramente que el porcentaje de kalihinenos tendía a disminuir.

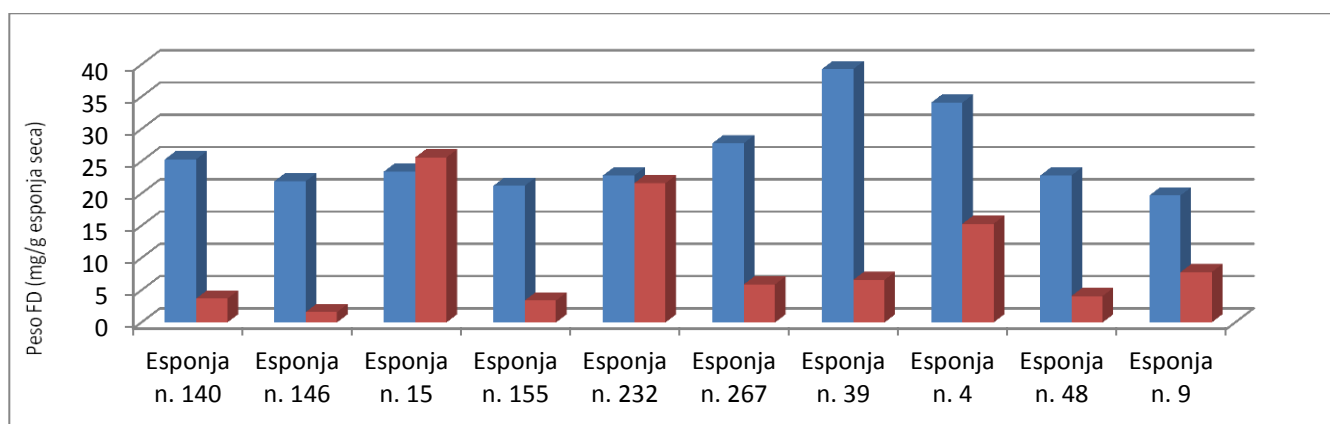
a) Protocolo P1B.4



Gráfica 6. Comparación del peso de la cantidad relativa de FD entre especímenes tratados con el protocolo **P1A.1** y las mitades tratadas con el protocolo **P1B.4**.

b) Protocolo P1B.1

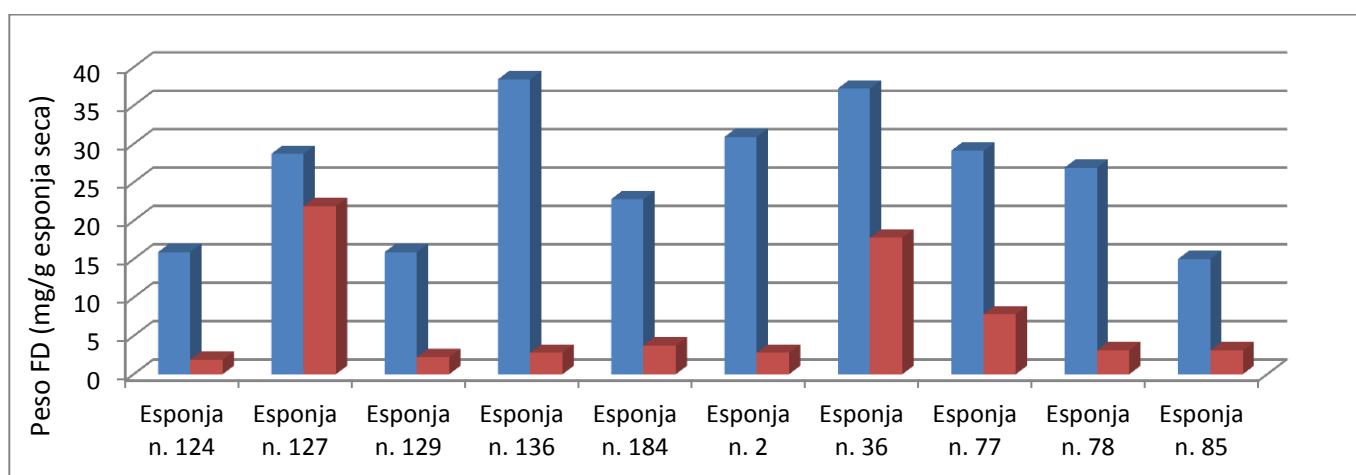
Se observa el mismo efecto en los especímenes tratados con el protocolo **P1B.1** de luz intensa en el tejido celular con decrecimiento de la cantidad de kalihinenos (Gráfica 7).



Gráfica 7. Comparación entre el peso de la cantidad relativa de FD en especímenes tratados con el protocolo **P1A.1** y las mitades correspondientes tratadas con el protocolo **P1B.1**.

c) Protocolo P1B.2

De la comparación de las mitades de los especímenes **P1A.1** con sus respectivas mitades tratadas con el protocolo **P1B.2** daño en el tejido de la esponja, se deduce también una disminución de la fracción **FD** tal como se observa en la Gráfica 8.



Gráfica 8. Comparación de la cantidad relativa de **FD** en especímenes tratados con los protocolos **P1A.1** y **P1B.2**.

De las 16 mitades de esponjas tratadas con el protocolo **P2.2** (esponjas exprimidas) se obtuvo 0.02669 mg de kalihinenos correspondientes a 9.8 g de peso de esponja seca, que representa un 0.00272%. Si comparamos dicho porcentaje con el obtenido a partir de las otras 16 mitades de las esponja del control 2 (protocolo **P2.1**) que supuso el 0.01% de kalihinenos.

Cuando se compara el peso relativo de los kalihinoles en función del peso de esponja seca (ecuación 3) se observa una pequeña variación: 21 mg/g peso seco de esponja el protocolo **P2.2** frente a 17.2 mg/g de peso seco de esponja del control 2 (protocolo **P2.1**). Pero si se cambia el peso relativo en función del contenido proteico se observa que prácticamente no hay casi variación: 2.17 mg/g en las tratadas y 2.10 mg/g en las esponjas sin tratar (ver Esquema 13).

Podemos deducir, por lo tanto, que todos los protocolos provocaron una disminución significativa en la producción de kalihinenos, a excepción del protocolo P2.1 (exprimir las esponjas) en el que se observan una pequeña variación en la producción de los compuestos **15**, **21** y **23**.

II.3.2.3 Publicaciones de kalihinenos posteriores a este estudio

Dada la importante actividad biológica que muestran este clase de terpenoides como es la citotóxica³⁷⁹, antiparasitaria,³⁸⁰ antimalárica,³⁸¹ antimicrobiana,³⁸² antifúngica,³⁸³ y antiincrustante,^{384, 385, 386} las esponjas pertenecientes al género *Acanthella* siguen siendo objeto de estudio numerosos químicos. Entre algunos ejemplos recientes se puede citar el aislamiento de los kalihipiranos A y B³⁸⁵ junto con el conocido 15-formamidokalihineno y biflora-4,9,15-trieno, que muestran una potente actividad antiincrustante frente a las larvas del percebe *Balanus amphitrite*.

En relación con la síntesis de estos compuestos, recientemente se han publicado avances en la preparación de (-)-kalihinol Y y el isocianato de-10-epi-kalihinol I.³⁸⁷

³⁷⁹ Fusetani N., Yasumuro K., Kawai H., Natori T., Brinen L., Clardy J. *Tetrahedron Lett.* **1990** 31, 3599.

³⁸⁰ Alvi K., Tenenbaum L., Crews P. J. *Nat. Prod.* **1991**, 54, 71.

³⁸¹ Trimurtulu G., Faulkner D. J. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 501.

³⁸² Braekman J. C., Daloze D., Gregoire F., Popov S., Van Soest R. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1994**, 103, 187.

³⁸³ Okino T., Yoshimura E., Hirota H., Fusetami N. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8637.

³⁸⁴ Hirota H., Tomono Y., Fusetami N. *Tetrahedron* **1996**, 52, 2359.

³⁸⁵ Okino T., Yoshimura E., Hirota H., Fusetami N. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 1081.

³⁸⁶ Wolf D., Schmitz F. J. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1524.

³⁸⁷ Miyaoka H., Abe Y., Kawashima E. *Chem. Pharm. Bull.* **2012** 60, 1224.

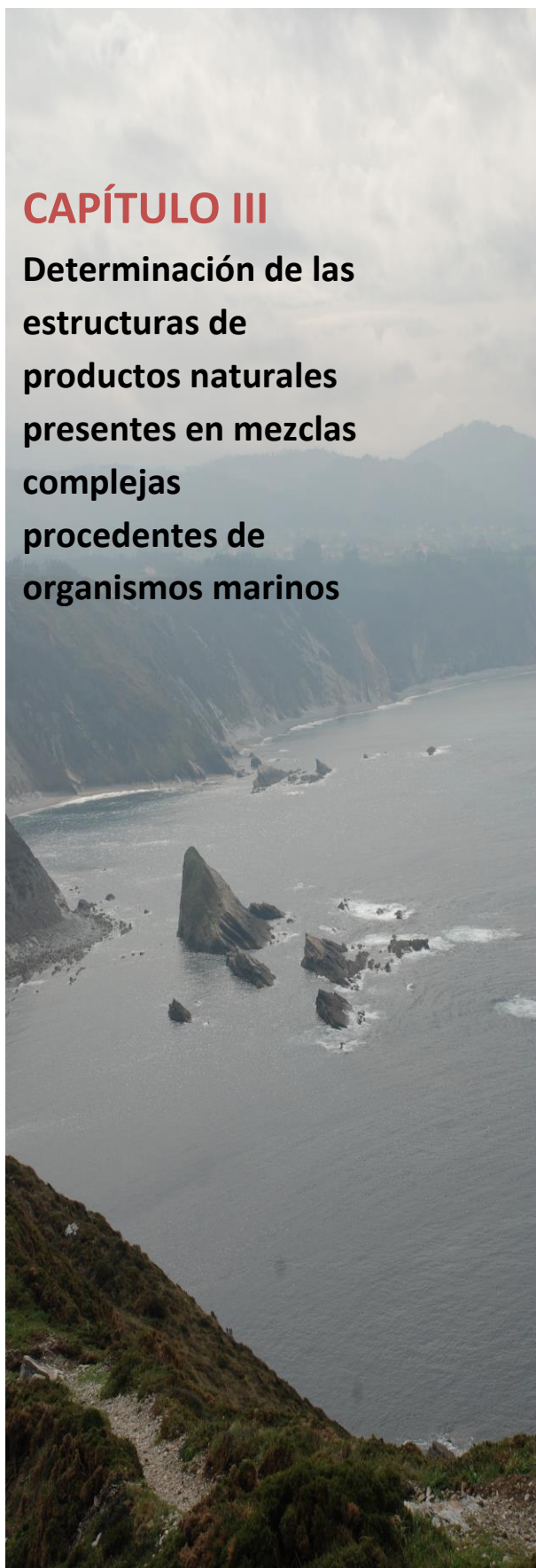
II.4 Conclusiones del capítulo II

Del estudio químico realizado a varias esponjas *Acanthella cavernosa* recolectadas en las Islas Fiyi (Océano Pacífico cerca de Pacific-Harbor en los arrecifes próximos a la laguna Benga) se dedujeron las siguientes conclusiones:

1. A partir de la fracción de diclorometano **FD** de las esponjas directamente recolectadas en su hábitat natural, se aislaron diez compuestos de origen diterpénico (**14-23**) utilizando diferentes métodos cromatográficos.
2. Utilizando diversas técnicas espectroscópicas de RMN y espectrometría de masas dichos compuestos se identificaron los compuestos conocidos kalihinol A (**20**), isokalihinol A (**21**) y kalihineno (**22**), junto con 10-formamidokalihineno (**14**), 15-formamidekalihineno (**15**), 10,15-bisformamidokalihineno (**16**), 6-hidroxikalihineno (**17**), 6-hidroxi-15-formamidokalihineno (**18**), 6-hidroxi-10-formamidokalihineno (**19**) y 6-hidroxi-10-formamido-15-isoticianokalihineno (**20**), que resultaron ser nuevos productos naturales.
3. Del estudio de acuicultura de la esponja se concluye que
 - a. De 109 especímenes individuales de esponjas de *A. cavernosa*, recolectadas en las islas Fiyi, sobrevivieron 88 de ellas, lográndose mantenerlas vivas y crecerlas en el laboratorio durante siete meses en un sistema de agua de recirculación denominado *Aqua-Pharm culture system*®.
 - b. Aunque las esponjas crecieron incrementando su biomasa, material celular y tejidos, dicho incremento no implicó un aumento en la producción de los compuestos de tipo kalihineno.
 - c. De todos los protocolos aplicados, el que implicó “exprimir las esponjas” fue el único que no implicó una drástica reducción tanto en el peso de la fracción FD como en la producción de kalihinenos.
 - d. Estos resultados muestran que en este caso las esponjas fuera de su hábitat natural disminuyen la producción de metabolitos secundarios.

CAPÍTULO III

**Determinación de las
estructuras de
productos naturales
presentes en mezclas
complejas
procedentes de
organismos marinos**



III.1 Objetivos

El objetivo principal de este capítulo fue la determinación de las estructuras de compuestos presentes en mezclas complejas procedentes de extractos de origen marino sin llegar a aislarlos en su estado puro, mediante la aplicación de dos diferentes aproximaciones.

Una primera aproximación se basó en la utilización de diversas técnicas espectroscópicas de RMN, principalmente de experimentos ^1H - ^1H COSY, para deducir las estructuras de una serie de compuestos que formaban parte de mezclas inseparables de ésteres de ácidos grasos derivados del bengazol procedentes de la fracción de diclorometano **FD** de la esponja *Jaspis coricea* que mostró una importante actividad citotóxica. Esta esponja fue recolectada por el Profesor Phillip Crews en Boi-Boi, en la Isla de Waga en Papua Nueva Guinea en una expedición realizada por su grupo de investigación en julio de 1990.

La segunda aproximación supuso la aplicación de la cromatografía líquida acoplada con la espectrometría de masas de alta resolución en la identificación de análogos de las meridianinas presentes en extractos de dos ascidias *Aplidium falklandicum* y *Aplidium meridianum* recolectadas en una zona remota geográficamente y poco explorada de la Antártida con el fin de establecer quimiotipos de estos organismos.

Para lograr el primer objetivo propuesto y para demostrar la utilidad de la primera aproximación se trazó el siguiente plan de trabajo:

1.1. Extracción de la esponja *Jaspis coricea* y posterior fraccionamiento con disolventes de diferentes polaridades.

1.2. Separación de los metabolitos secundarios de interés mediante la utilización de diversas técnicas cromatográficas: columnas de gel de sílice, Sephadex LH20 y de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

1.3. Identificación estructural de los metabolitos presentes en las fracciones mezcla inseparables mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de protón monodimensionales (RMN- ^1H) y carbono trece (RMN- ^{13}C) y bidimensionales ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY HETCOR; espectrometría de masas de impacto electrónico (EI) y bombardeo de átomos acelerados (FAB).

Para lograr el segundo objetivo con la aplicación de la segunda aproximación basada en el estudio de mezclas mediante HPLC-HRMS, se trazó el siguiente plan de trabajo:

2.1 Extracción, fraccionamiento, aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios de interés de los tunicados *Aplidium falklandicum* y *Aplidium meridianum*, mediante la utilización de diversas técnicas cromatográficas, principalmente Sephadex LH20 y HPLC-MS.

2.2. Estudio analítico mediante HPLC/MS de transformada de Fourier tipo Orbitrap de las fracciones mezclas obtenidas, con el fin de observar los porcentajes presentes de meridianinas y deducir a partir de ellos relaciones quimiotaxonómicas.

2.3. Búsqueda de nuevos compuestos análogos de las meridianinas de fórmulas moleculares diferentes a las publicadas en la bibliografía.

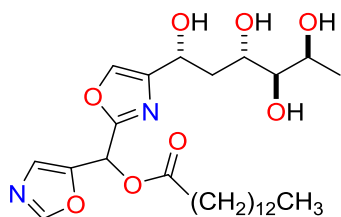
III.2 Resultados y discusión



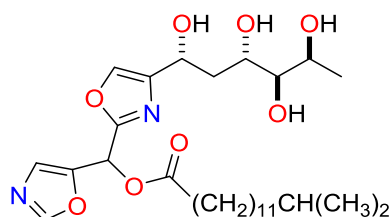
III.2.1.1 Antecedentes bibliográficos

Las esponjas del género *Jaspis* (familia *Jaspidae*) son una fuente muy rica de metabolitos secundarios con muy interesantes propiedades antibióticas, antiparasitarias, antifúngicas,³⁸⁸ insecticidas^{389,390} y citotóxicas.³⁹¹

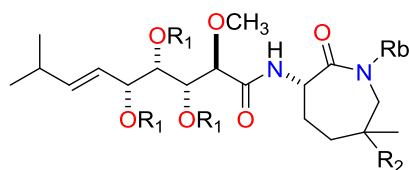
Entre los diversos compuestos aislados de esta esponja se encuentran los bengazoles, estructuras que contienen un esqueleto de bisoxazol, aislándose en muchas ocasiones junto con otro tipo de compuestos denominados bengamidas. Los primeros compuestos aislados fueron los bengazoles A y B, descritos en 1988 por Phillip Crews y colaboradores.³⁹² La síntesis de bengazol A ha sido abordada de manera independiente por los grupos del Pr. Molinski y del Pr. S. Ley.³⁹³



bengazol A



bengazol B

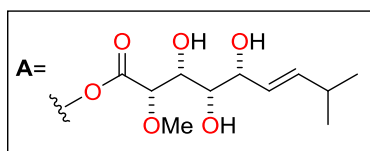


$R_1 = \text{H}, \text{Ac}$

$R_b = \text{H}, \text{CH}_3$

$R_2 = \text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3, \text{OH}, \text{OAc}, \text{H}, \mathbf{A}$

bengamidas



³⁸⁸ Scott V.R., Boehme R., Matthews, T. R. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1988**, 32, 1154.

³⁸⁹ Zabriskie T. E., Klocke J. A., Ireland C. M., Marcus A. H., Molinski T. F., Faulkner D. J., Xu C., Clardy J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3123.

³⁹⁰ Crews P., Manes L. V., Bohler M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2797.

³⁹¹ Inman W., Crews P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2822.

³⁹² Adamczeski M., Quiñoá E., Crews P. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1598.

³⁹³ a) Mulder R. J., Shafer C. M., Dalisay D. S., Molinski T. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 2928. b) Bull J. A., Balskus E. P., Horan R. A. J., Langner M., Ley S. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6714.

III.2.1.2 Estudio químico de *Jaspis cf. coricea*

III.2.1.2.1 Identificación y clasificación

La esponja *Jaspis. cf. coricea* (número colección UCSC 90187, (ver Figura 118) fue recogida en Boi-Boi, en la isla de Waga en Papua Nueva Guinea, en julio de 1990. Es una esponja incrustante con un grosor de 0.5-2 cm, de color amarillo-anaranjado que después de ser recolectada torna a color marrón.

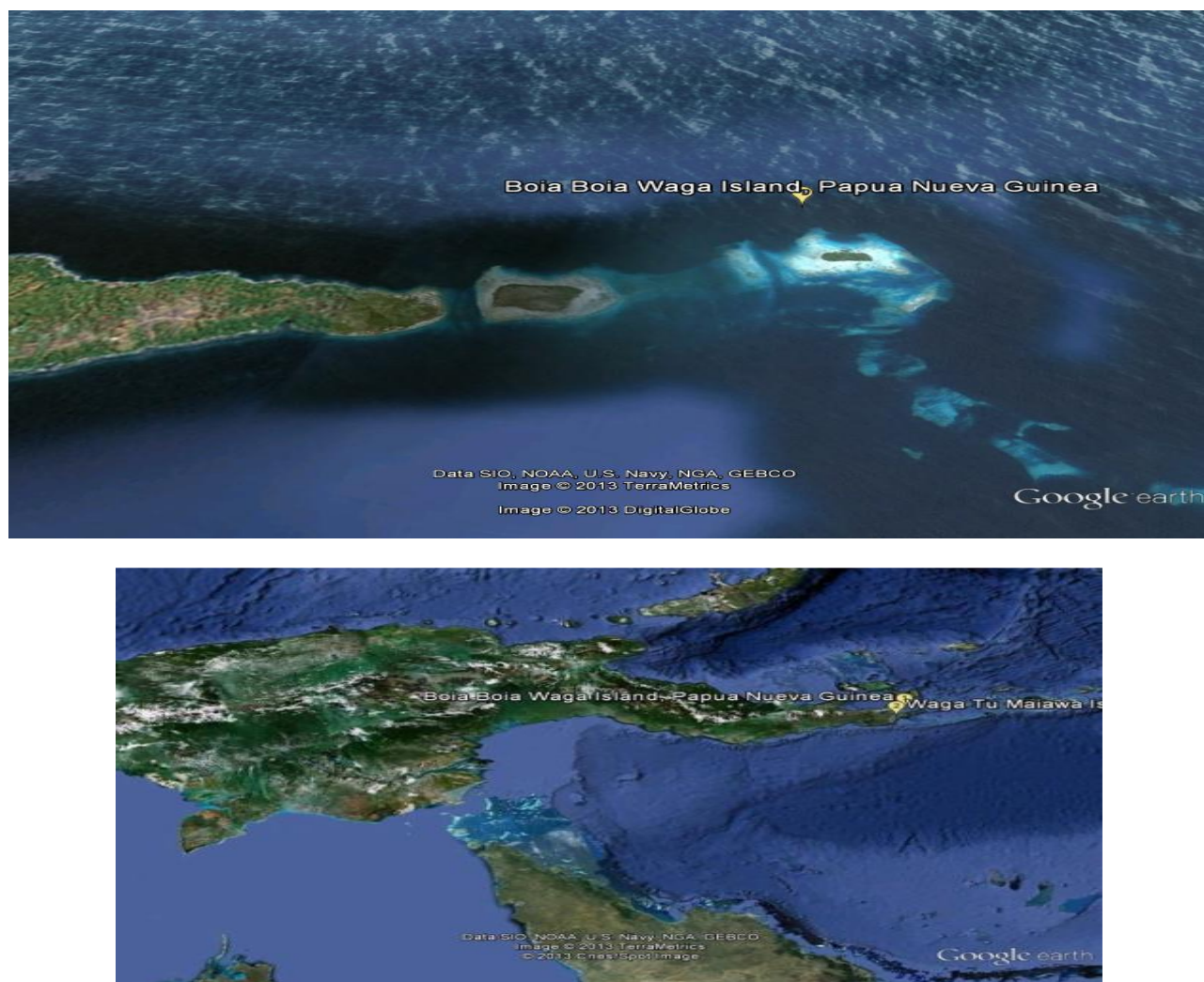


Figura 117. Localización de los lugares de recolección de *Jaspis cf. coricea* (imágenes obtenidas de Google Earth).

El estudio taxonómico de la esponja fue realizado por el profesor Rob van Soest y la Dra. María Cristina Díaz.

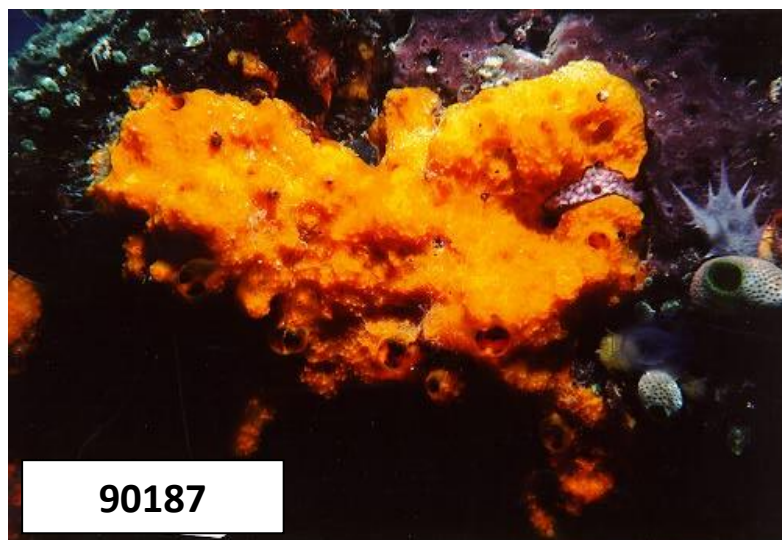
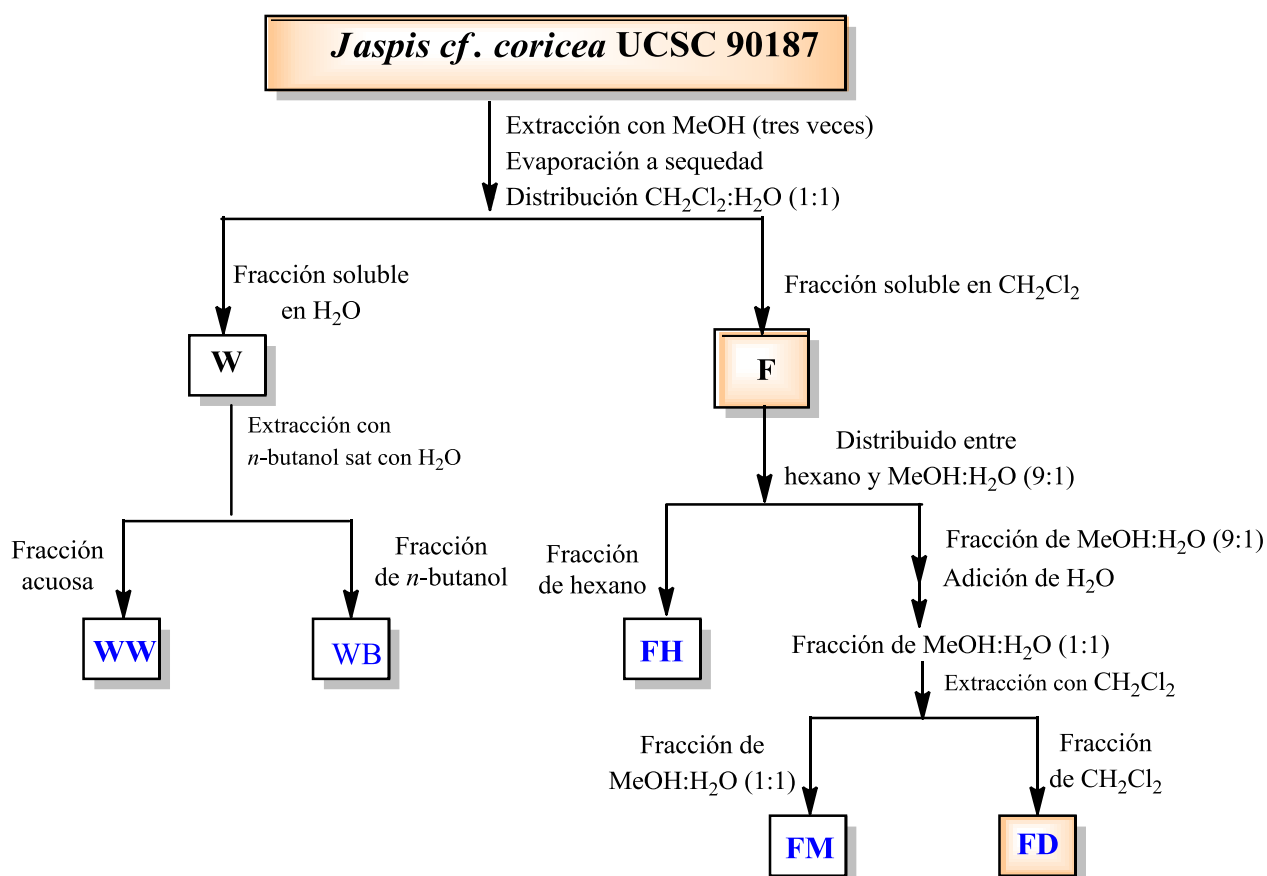


Figura 118. Fotografía acuática de la esponja *Jaspis cf. coricea*

III.2.1.2.2 Extracción y fraccionamiento

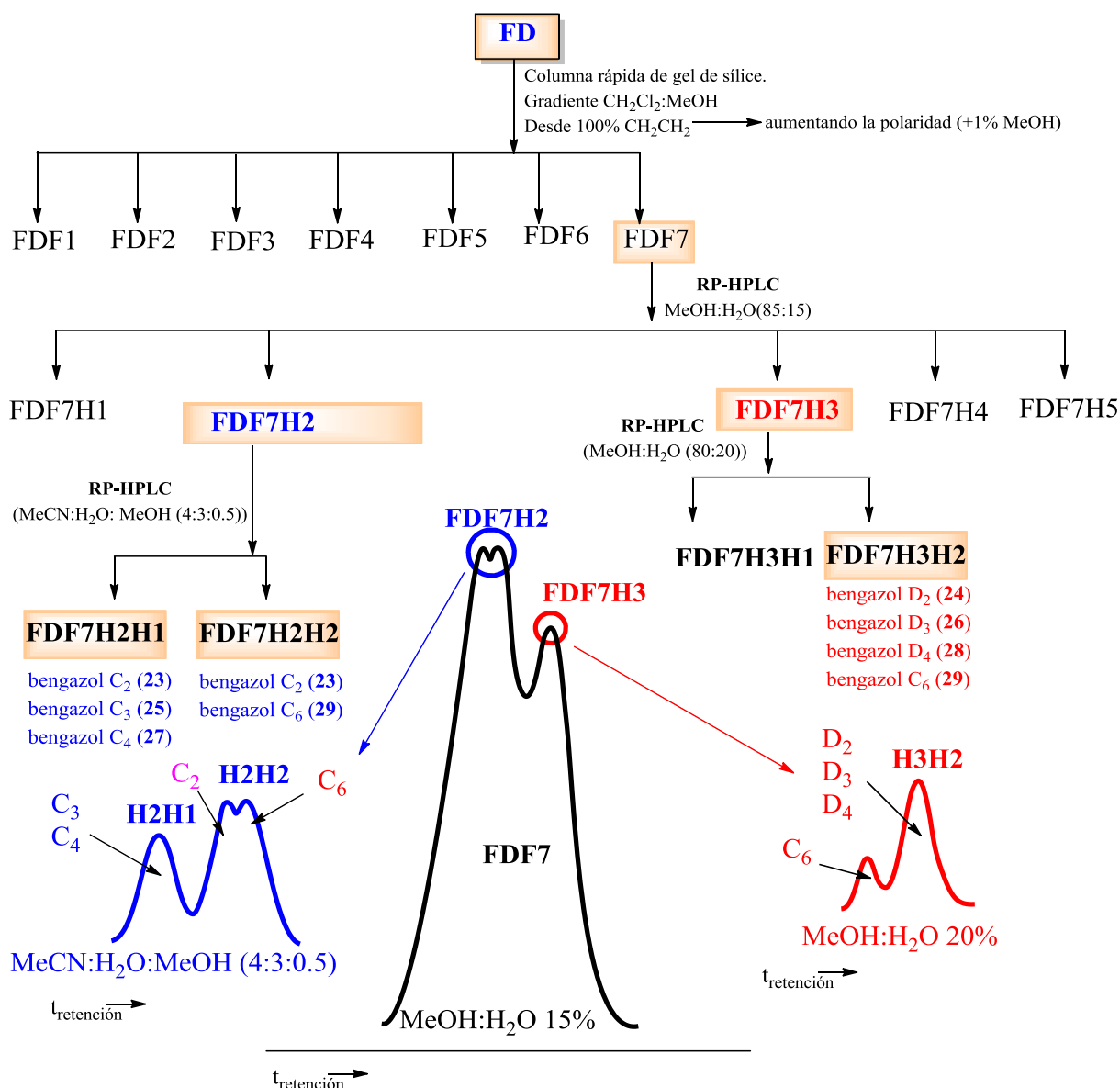
La esponja se seccionó en pequeños trozos, extrayéndose posteriormente repetidas veces con metanol. Este extracto metanólico se fraccionó entre distintas mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad, aprovechándose así el distinto coeficiente de reparto que presentan los componentes de los extractos orgánicos en cada uno de los sistemas de disolvente (ver Esquema 15).



Esquema 15. Fraccionamiento del extracto metanólico de la esponja *Jaspis cf. coricea*.

III.2.1.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción de diclorometano (**FD**) mostró señales muy interesantes por RMN de ^{13}C , además de una elevada actividad citotóxica frente a células tumorales colon-205 [$\text{GI}_{50}=0.181\ \mu\text{M}$ ($0.085\ \mu\text{g}/\text{mL}$), $\text{TGI}=1.5\ \mu\text{M}$, $\text{LC}_{50}=5.25\ \mu\text{M}$] y melanoma, SK-MEL-5, $\text{GI}_{50}=1.13\ \mu\text{M}$, $\text{TGI}=4.83\ \mu\text{M}$, $\text{LC}_{50}=4.83\ \mu\text{M}$ ($\text{LC}_{50}<0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$), por lo que se procedió a su posterior estudio.³⁹⁴ La cromatografía en columna rápida de gel de sílice de esta fracción **FD**, utilizando como eluyente un gradiente de metanol y diclorometano, rindió siete fracciones, de las cuales la fracción **FDF7** presentaba las señales más interesantes en su espectro de RMN de ^{13}C . Dicha fracción se sometió a separación mediante HPLC dando lugar a una serie de mezclas complejas de un mismo tipo de compuestos, que no pudieron ser separadas a pesar de numerosos intentos infructuosos de purificación. Por esta razón, tuvieron que ser estudiadas como fracciones mezclas (ver Esquema 16).

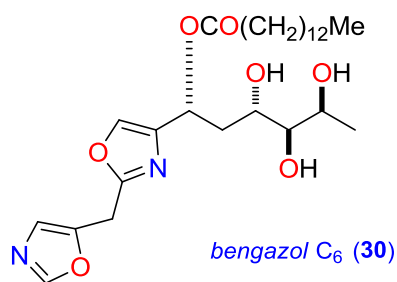
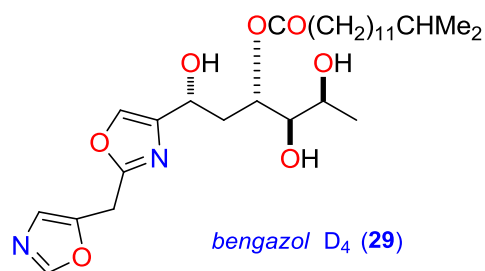
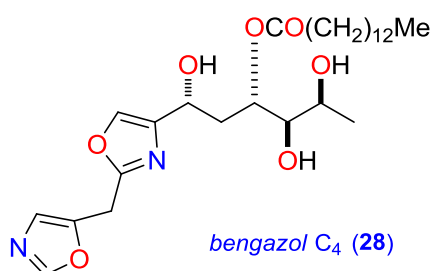
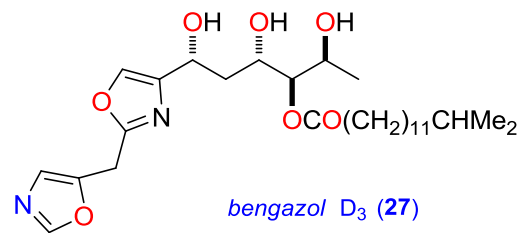
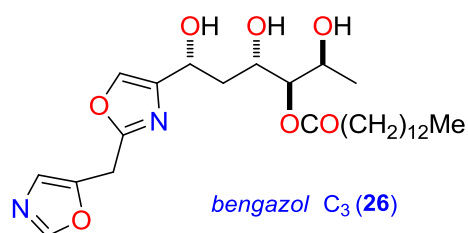
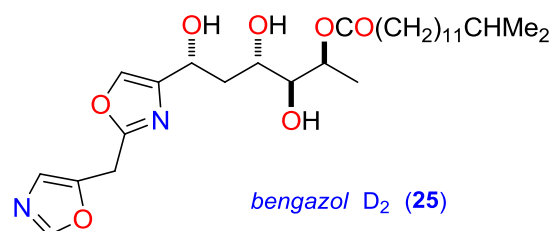
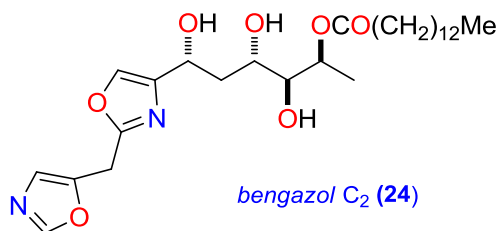


Esquema 16. Procedimiento empleado en la separación de la fracción **FD** y perfil cromatográfico de HPLC de la fracción **FDF7**.

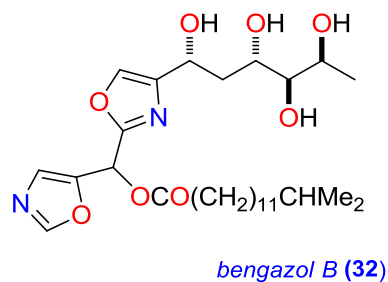
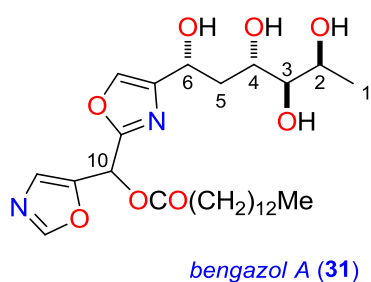
³⁹⁴ $\text{GI}_{50}=\text{ED}_{50}=\text{IC}_{50}$, ver Raub M.F., Cardelha J.H., Choudhary M.I., Ni C.-Z., Clardy J., M.C. Alley *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3178.

III.2.1.2.4 Determinación estructural

Los compuestos presentes en las mezclas fueron los siguientes nuevos productos naturales:



Además se lograron aislar los compuestos conocidos siguientes:



La elucidación estructural de los compuestos presentes en las fracciones-mezclas sin llegar a aislarlos, se llevó a cabo mediante la aplicación de diversas técnicas espectroscópicas de RMN, espectrometría de masas, especialmente mediante ionización FAB en modo ion positivo.

Las fracciones obtenidas después de numerosos intentos de separación de HPLC en fase invertida con diferentes fases móviles, se denominaron **FDC7H2H1**, **FDC7H2H2** y **FDC7H3H2** (ver Esquema 16). Por RMN de protón se pudo deducir que correspondían a mezclas de ésteres de bengazoles y mediante análisis de sus espectros de masas FAB en modo de ion positivo se pudo establecer sus pesos moleculares tal como se explicará en las siguientes secciones. Para determinar el tipo de esqueleto común de la mezcla de ésteres, se realizó en primer lugar su hidrólisis básica.

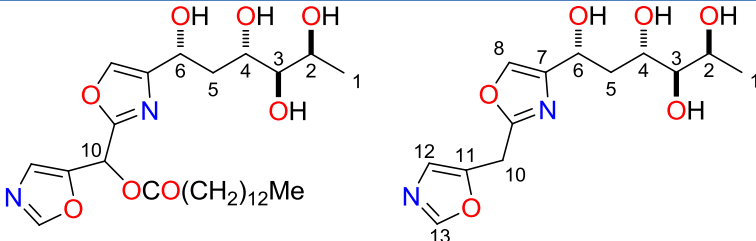
III.2.1.2.4.1 Hidrólisis de las mezclas de bengazoles: *Bengazol Z* (**33**)

Con el fin de determinar el esqueleto común de todos los ésteres de bengazoles, se decidió hacer una hidrólisis básica de cada fracción-mezcla, obteniéndose en los tres casos el mismo compuesto al que se denominó bengazol Z (**33**), cuya determinación estructural se describe a continuación.

Los datos obtenidos del espectro de RMN de ^{13}C y DEPT-135 de **33**, conjuntamente con el análisis de su espectro de masas FAB de baja resolución, el cual mostró el ion pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 299, permitió deducir su fórmula molecular como $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$.

La comparación de los datos espectrales de RMN del compuesto **33** con los correspondientes al compuesto bengazol A (**31**) (Tabla 26 y 27) fue crucial para el establecimiento de las diferencias y semejanzas entre ambos compuestos. Así, el valor de la desviación media, MD de 0.11 ppm (Tabla 26) entre los desplazamientos químicos de los carbonos del fragmento C1-C6 en los espectros de RMN de ^{13}C de los compuestos **31** y **33**, conjuntamente con la gran similitud entre las constantes de acoplamiento de los protones correspondientes (desviación media, MD de 0.48 Hz, ver Tabla 27) en los espectros de RMN de ^1H de ambos compuestos, permitió deducir que bengazol Z (**33**) poseía la misma configuración relativa ($2S^*, 3R^*, 4S^*, 6R^*$) que bengazol A (**31**)³⁹² en los centros quirales presentes en dicho fragmento.

Tabla 26. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de los carbonos del fragmento C1-C6 en bengazol A (**31**) y bengazol Z (**33**).



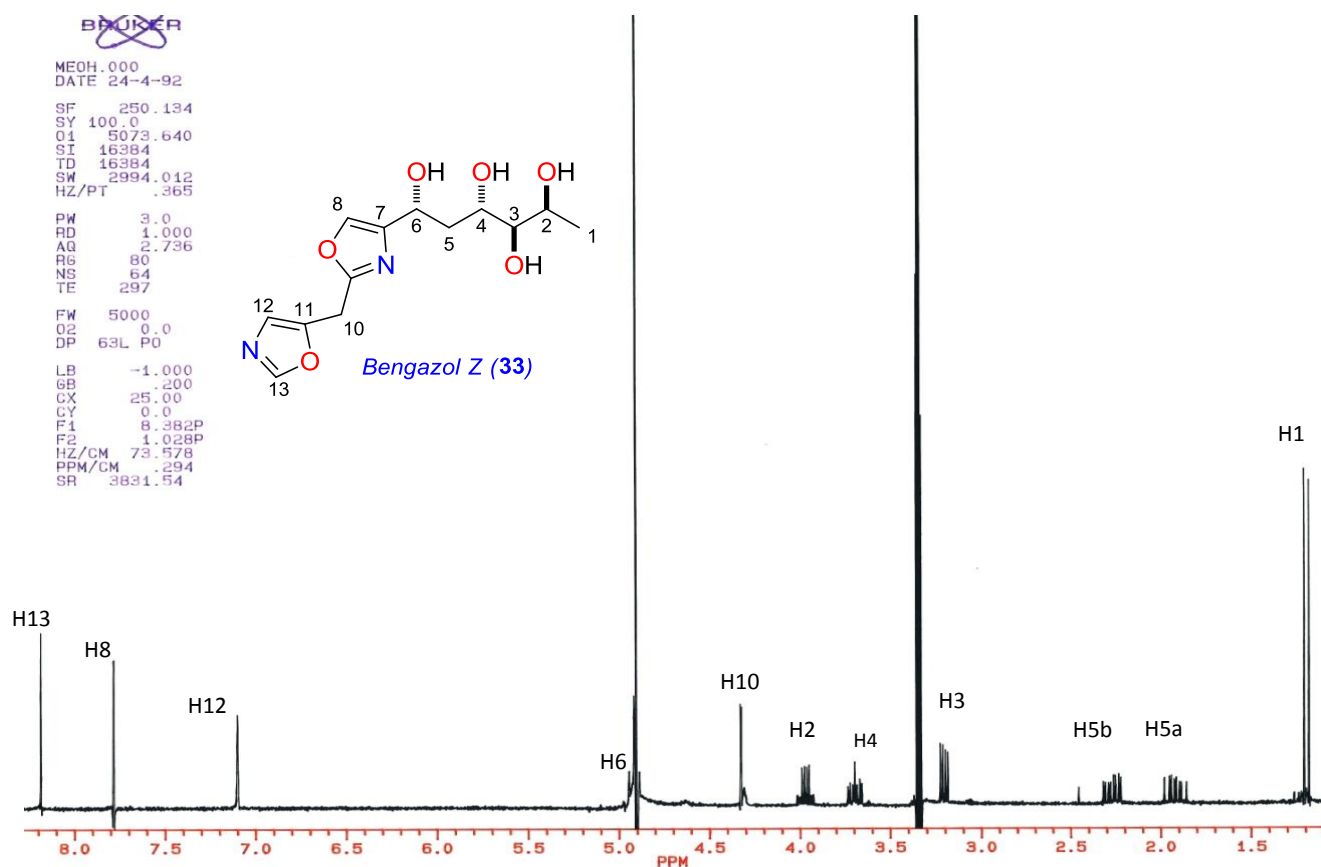
Posición	Bengazol A (31) δ_c (ppm)	Bengazol Z (33) δ_c (ppm)	$\Delta\delta$
C-1	19.9	19.9	0
C-2	67.7	67.7	0
C-3	78.8	78.7	0.1
C-4	71.7	71.3	0.4
C-5	40.4	40.5	0.1
C-6	66.2	66.3	0.1
C-8	138.0	137.3	
C-12	127.5	124.7	

MD = 0.11 ppm

Tabla 27. Comparación de las J_{H-H} de los protones del fragmento C1-C6 en los espectros de RMN de 1H de bengazol A (**31**) y bengazol Z (**33**).

J	Bengazol A (31) J (Hz)	Bengazol Z (33) J (Hz)	ΔJ
J_{1-2}	6.6	6.5	0.1
J_{2-3}	3.3	3.2	0.1
J_{3-4}	6.6	6.8	0.2
J_{4-5a}	9.0	9.5	0.5
J_{4-5b}	3.3	2.7	0.6
J_{5a-5b}	14.1	14.1	0
J_{5a-6}	5.7	7.0	1.3
J_{5b-6}	5.7	6.8	1.1

MD = 0.48 Hz


Figura 119. Espectro de RMN de 1H (250 MHz, CD_3OD) de bengazol Z (**33**).

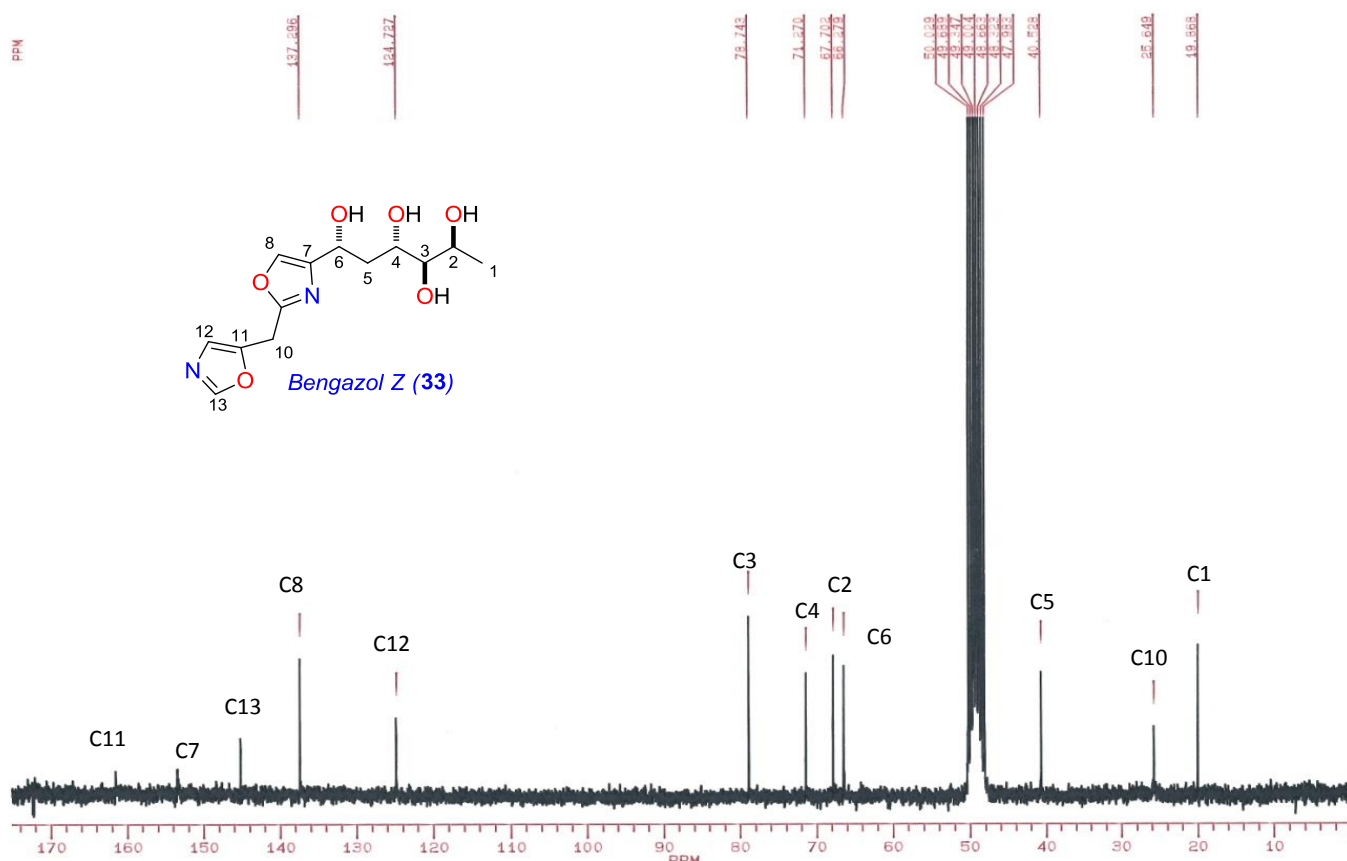


Figura 120. Espectro de RMN de ^{13}C (62.3 MHz, CD_3OD) de bengazol Z (33).

Por otra parte, el cambio en el desplazamiento químico del carbono metínico C12, junto con la presencia de un carbono adicional metilénico (C10) a δ_{C} 25.6 ppm en el RMN de ^{13}C en **33** en relación con el de bengazol A (**31**), indicó la ausencia de esta posición oxigenada presente en bengazol A (**31**). La localización de este carbono metilénico en la posición C10 se confirmó mediante el experimento heteronuclear HETCOR ^{13}C - ^1H COSY ($J = 9$ Hz) observada en una de las mezclas que se utilizaron para la obtención de bengazol Z (**33**) (ver Figura 142) al mostrar una correlación clave entre los protones H10 a δ_{H} 4.32 con el carbono C9 a δ_{C} 161.4.

Todos estos datos indicaron que bengazol Z (**33**) posee el mismo esqueleto que bengazol A (**31**), conservando la misma estereoquímica relativa para el fragmento C1-C6, pero diferenciándose únicamente en la ausencia del sustituyente oxigenado en C10.

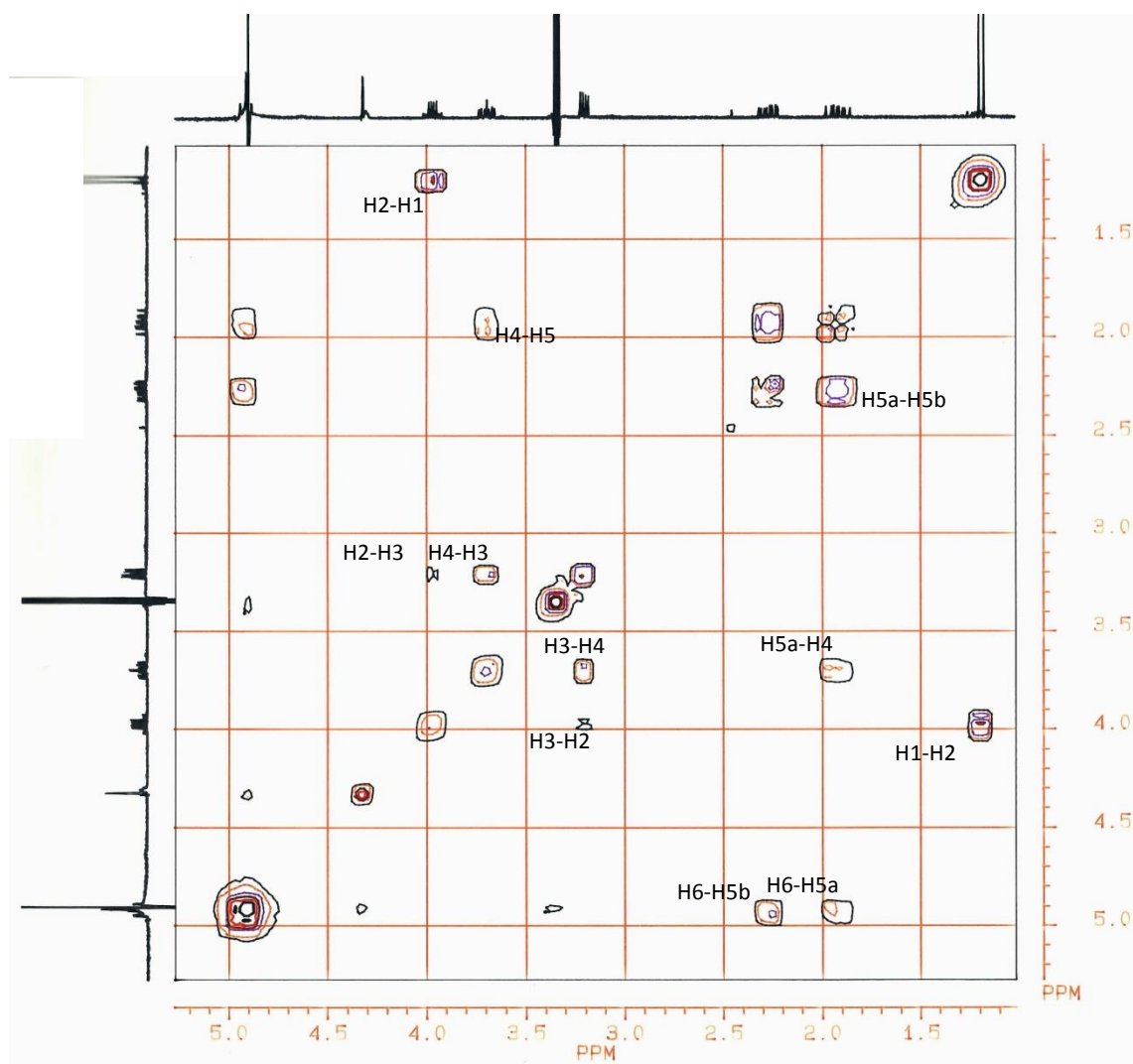
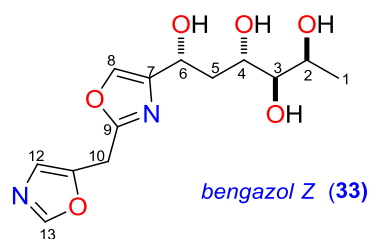
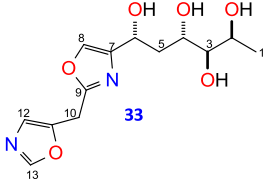


Figura 121. Espectro ^1H - ^1H COSY (250 MHz, CD_3OD) del bengazol Z (33).

Tabla 28. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C en CD_3OD de bengazol Z (**33**).

	δ_{H} mult.	δ_{C} (mult.)
	(valores de J en Hz Tabla 27)	
1	1.19 d J_{1-2} 6.5	19.9 (c)
2	3.98 dc J_{2-3} 3.2	67.7 (d)
3	3.21 dd J_{3-4} 6.8	78.7 (d)
4	3.70 ddd J_{4-5a} 9.5 J_{4-5b} 2.7	71.3 (d)
5a/5b	2.24 ddd 1.92 ddd J_{5a-5b} 14.1	40.5 (t)
6	4.90 dd J_{5a-6} 7.0 J_{5b-6} 6.8	66.3 (d)
7	-	145.1 (s)
8	7.78 sa	137.3 (d)
9	-	161.4 (s)
10	4.32 d	25.6 (t)
11	-	148.2 (s)
12	7.09 sa	124.7 (d)
13	8.18 s	153.3 (s)

III.2.1.2.4.2 Estudio de las fracciones-mezcla

Después de infructuosos intentos de separación mediante HPLC usando diferentes mezclas de disolventes, se decidió hacer un análisis estructural de los compuestos presentes en cada fracción-mezcla.

Cada una de las tres fracciones-mezclas se sometió a espectrometría de masas FAB (modo ion positivo), observándose la presencia de compuestos que poseían pesos moleculares de 508 y 522 uma. La diferencia entre el peso molecular de los compuestos presentes en las mezclas y el peso molecular de bengazol Z (**33**), así como los datos de RMN de ^1H , indicó que se trataban de derivados esterificados de **33** con ácidos grasos saturados.

La presencia de una señal triplete a δ_{H} 0.92, correspondiente a un metilo terminal, y/o una señal doblete a δ_{H} 0.91, característico de los metilos de un grupo isopropilo, en los espectros de RMN de ^1H de las fracciones-mezclas, indicó que los ácidos grasos que esterifican al bengazol Z (**33**) en dichas mezclas deben ser el ácido mirístico, como en bengazol A (**31**), y/o el ácido 13-metilmirístico, como en bengazol B (**32**).

Adicionalmente, la ausencia del grupo hidroxilo en la posición C10 en bengazol Z (**33**), indicó que dichos ácidos deberían esterificar los grupos hidroxilo de las posiciones 2, 3, 4 ó 6. Se plantearon por tanto 8 posibles combinaciones, denominadas bengazoles C₂, C₃, C₄ y C₆ a los que poseyeran el éster miristato, y bengazoles D₂, D₃, D₄ y D₆ a los que tuvieran el éster 13-metilmiristato. Según esta nomenclatura, los subíndices indican la posición del éster en el esqueleto de bengazol Z (**33**) (ver Tabla 29).

Para determinar la posición esterificada en cada bengazol, se estudió el patrón de acomplamiento de los protones del fragmento C1-C6 partiendo de los del grupo metilo (H1) que resonaron en los espectros de RMN ^1H entre 0.90 y 1.25 ppm en función de la posición esterificada. De esta manera, a partir del espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H COSY se pudo determinar los sistemas de espín entre los protones H1, H2, H3, H4, H5 (H5a y H5b) y H6 para cada compuesto. Una vez diferenciados dichos sistemas de spin para cada uno de los

bengazoles que componen las fracciones-mezcla, la localización de las posiciones esterificadas se hizo en función del protón que resonase a mayor frecuencia. Adicionalmente, las integrales de los metilos terminales de los dos tipos de ácidos grasos (mirístico ó 13-metilmirístico), permitieron distinguir en cada una de ellas las proporciones de los componentes de la fracción mezcla, tal como se describirá a continuación.

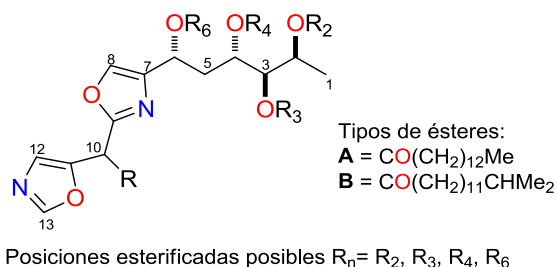


Tabla 29. Posibles compuestos presentes en las fracciones-mezcla de bengazoles.

Compuesto	R	R ₂	R ₃	R ₄	R ₆
31	O-A	H	H	H	H
32	O-B	H	H	H	H
24	H	A	H	H	H
25	H	B	H	H	H
26	H	H	A	H	H
27	H	H	B	H	H
28	H	H	H	A	H
29	H	H	H	B	H
30	H	H	H	H	A
30H	H	H	H	H	B
33	H	H	H	H	H

III.2.1.2.4.2.1 Fracción-mezcla 1 (FDF7H2H2)

La primera fracción-mezcla estudiada fue la **FDF7H2H2** (ver Esquema 16) por ser la menos compleja. Su espectro de masas de baja resolución FAB (ión positivo) (Figura 122) mostró iones pseudomoleculares a m/z 509 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y m/z 531 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ que se corresponden con la fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{N}_2$. Esto indicó que los bengazoles presentes en la mezcla deberían de estar esterificados únicamente con el ácido mirístico ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{12}\text{Me}$).

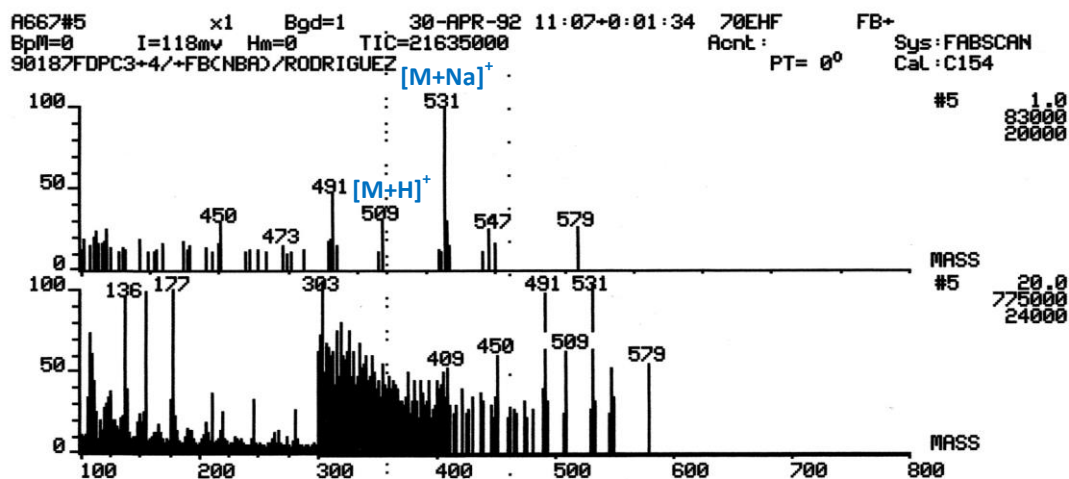


Figura 122: Espectro de masas (+)-FAB de la fracción-mezcla **FDF7H2H2**.

La presencia de dos únicas señales dobles a δ_H 1.15 y 1.25 (ambos protones H1) (Figura 123) indicó que la fracción-mezcla sólo contenía dos bengazoles isoméricos, compuestos **24** y **30**. Para determinar la posición de los ésteres, se observó el patrón de acoplamiento comenzando por los protones H1. Así, el acoplamiento del doblete a δ_H 1.25 (H1) con el protón H2 a δ_H 5.14, permitió deducir que para el bengazol **24** la posición esterificada se localizaba en C2. La localización de la posición esterificada en C6 del segundo bengazol, compuesto **30**, se dedujo a partir de la correlación que se observa en el espectro ^1H - ^1H COSY (ver Figura 126) entre una señal a δ_H 6.05 (H6) y los dos protones diasterotópicos H5 a δ_H 2.40 (H5a) y 2.00 (H5b). El desplazamiento a mayor frecuencia (+1.16 ppm) de H6 en **30**, en relación con el de ese protón en bengazol Z (**33**), indicó que el OH en C6 en **30** estaba esterificado con el ácido mirístico. El triplete del metilo terminal a δ_H 0.925 del grupo miristato se señala con ✓ en la Figura 123.

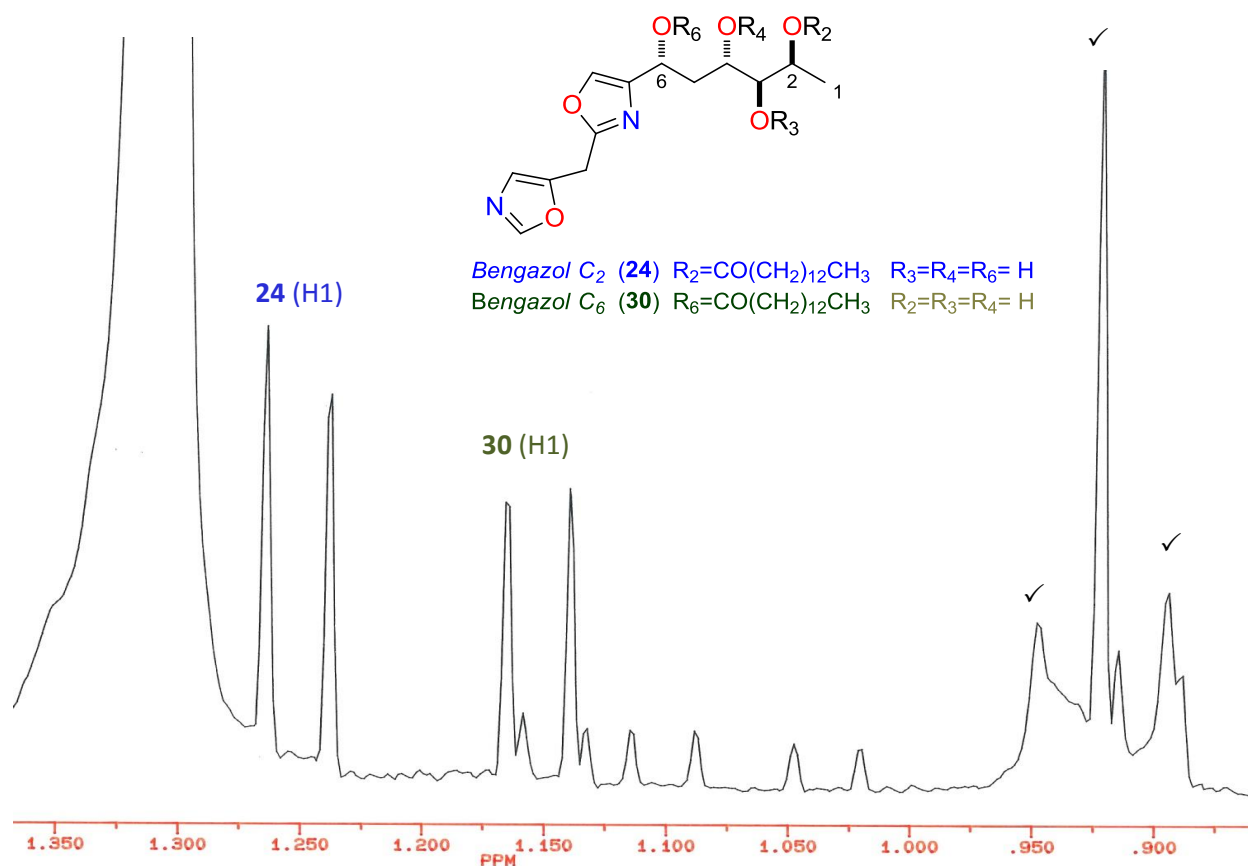


Figura 123. Ampliación del espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla FDF7H2H2.

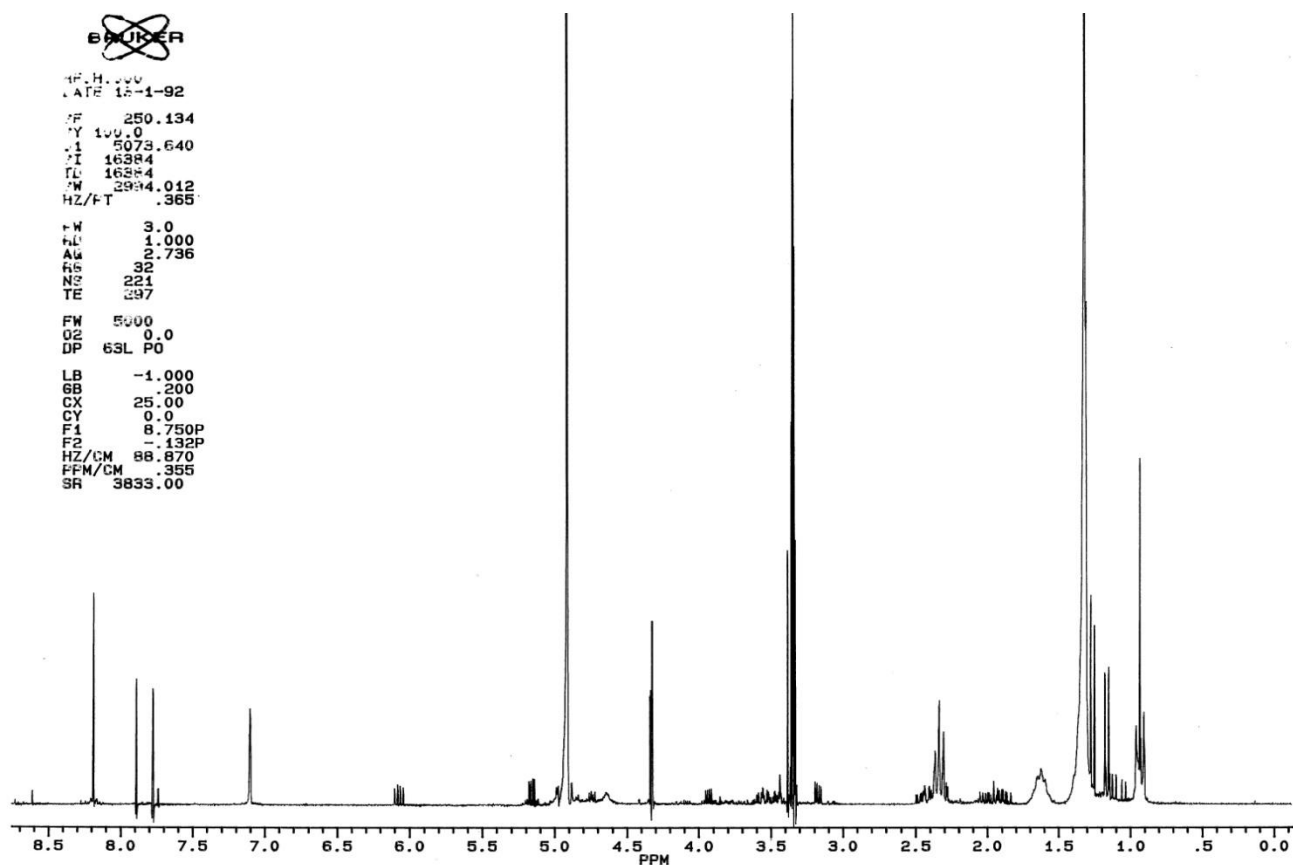


Figura 124. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla FDF7H2H2.

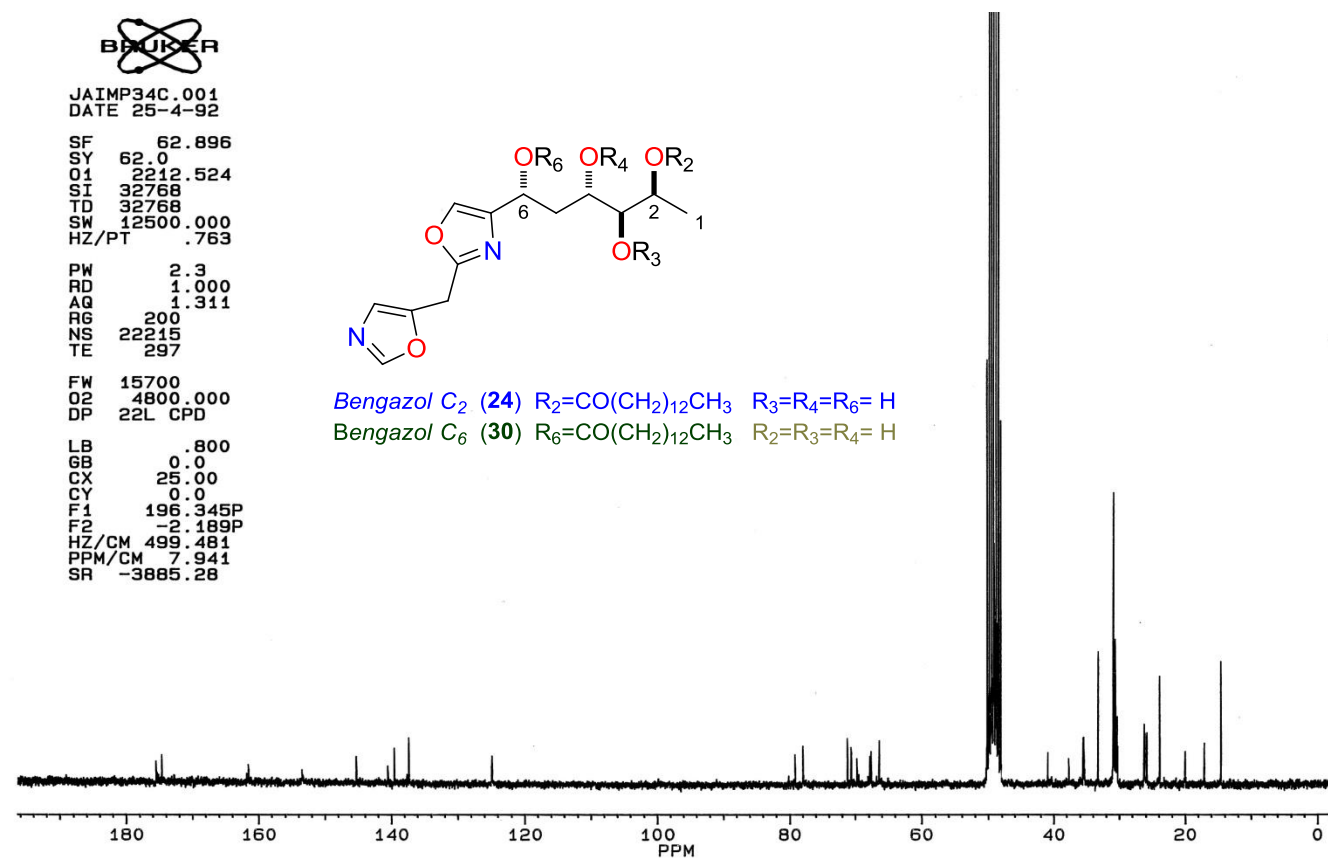


Figura 125. Espectro de RMN ^{13}C (62.3 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla FDF7H2H2.

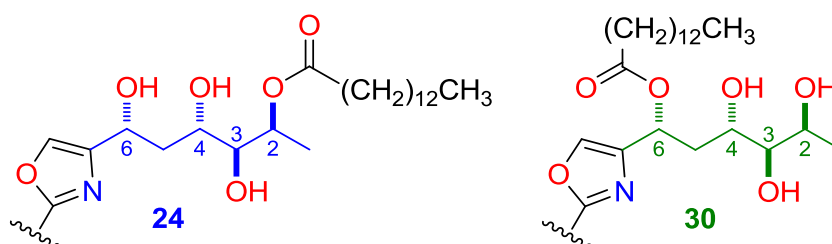
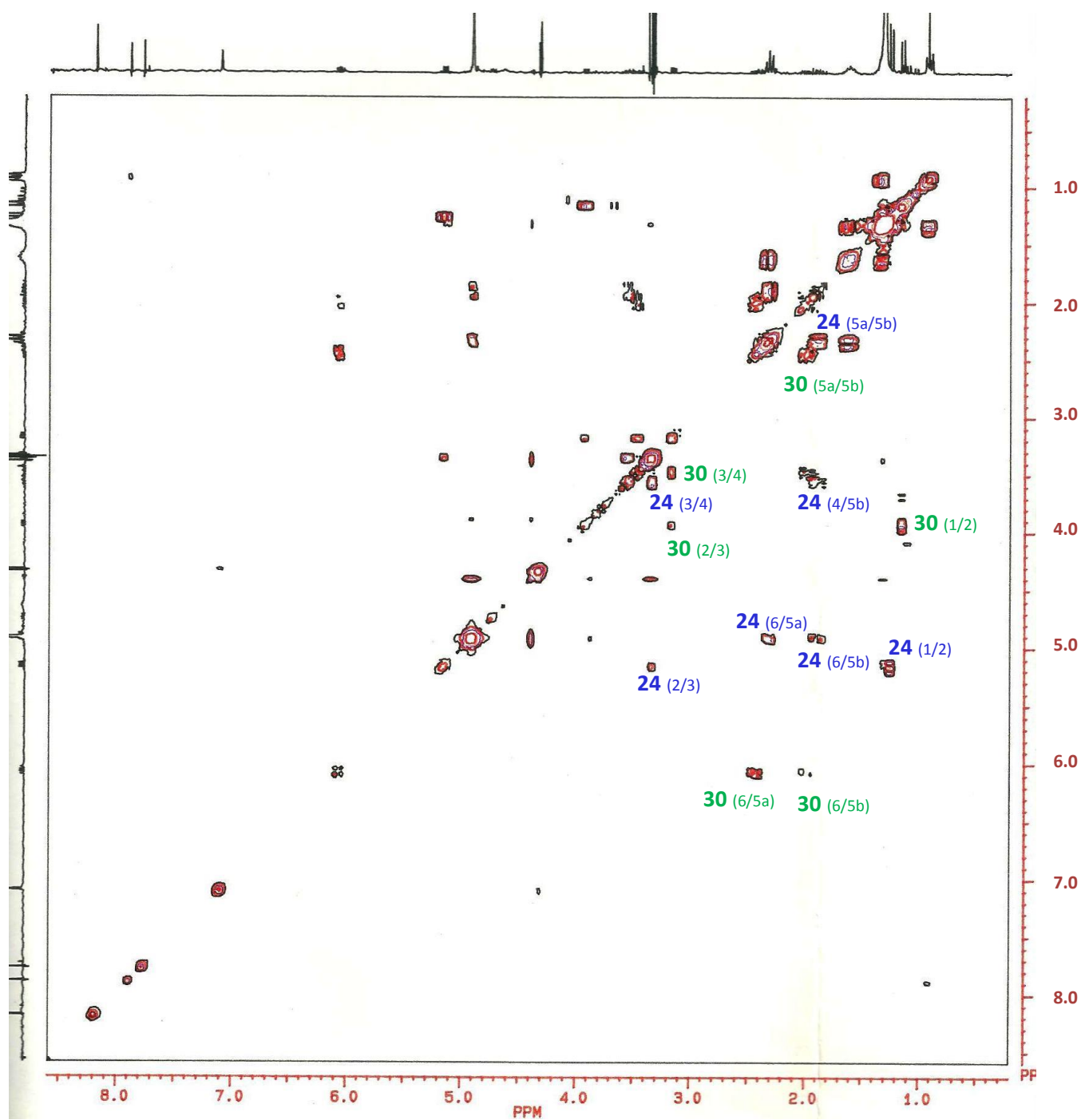
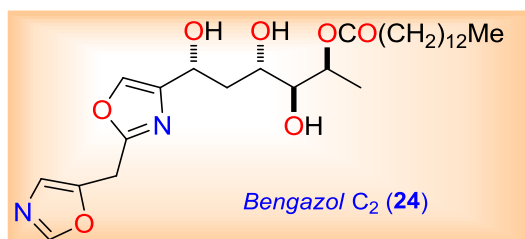


Figura 126. Espectro ^1H - ^1H COSY (250 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla **FDF7H2H2**.

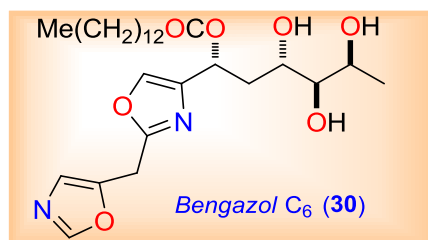
Los dos compuestos **24** y **30** se denominaron bengazol C₂ y C₆ respectivamente, siendo dos nuevos metabolitos que no se habían descrito anteriormente en la bibliografía.

Tabla 30. Datos de RMN de ¹H y ¹³C (250 MHz, CD₃OD) para el bengazol C₂ (**24**).



Posición	δ_H mult. J (Hz)	δ_C
1	1.25 d 6.5	16.9
2	5.14 d 6.5 3.2	71.0
3	3.33 debajo del disolvente	77.3
4	3.54 ddd 10.0 2.5	70.5
5a/5b	2.27 m/1.88 m	40.7
6	4.90 debajo del disolvente	66.2
7		145.1
8	7.76 s	137.2
9		161.4
10	4.31 d, 1.0	25.7
11		148.2
12	7.09 sa	124.7
13	8.17 s	153.3

Tabla 31. Datos de RMN de ¹H y ¹³C (250 MHz, CD₃OD) del bengazol C₆ (**30**).



Posición	δ_H mult. J (Hz)	δ_C
1	1.16 d 6.5	19.9
2	3.94 dc 6.5, 3.4	67.7
3	3.17 d 6.8 3.4	79.0
4	3.51 m	69.6
5a/5b	2.40 m/2.0 m	37.5
6	6.05 dd 9.8 5.2	67.5
7		149.0
8	7.89 s	139.4
9		161.5
10	4.33 d, 1.0	25.6
11		148.2
12	7.10 sa	124.7

III.2.1.2.4.2.2 Fracción-mezcla 2 (FDF7H2H1)

La fracción de HPLC FDF7H2H1 presentó en el espectro masas de baja resolución FAB (ion positivo) iones pseudomoleculares a m/z 509 $[M+H]^+$ y m/z 531 $[M+Na]^+$, concordantes con la fórmula molecular $C_{27}H_{44}N_2O_7$. Esto sugirió que los ésteres de bengazoles presentes en esta fracción-mezcla eran únicamente derivados del ácido mirístico ($HOC(CH_2)_{12}Me$).

La presencia de tres señales dobletes a δ_H 1.10, 1.15 y 1.25 (todos protones H1), indicó que la fracción-mezcla contenía tres bengazoles isoméricos, compuestos **24**, **26** y **28** (ver Figura 128). Esto se confirmó cuando se realizó la hidrólisis básica metanólica de una alícuota de la fracción-mezcla que dio lugar a un solo éster metílico (el miristato de metilo), cuyo espectro de masas (+)-FAB mostró su ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 243.

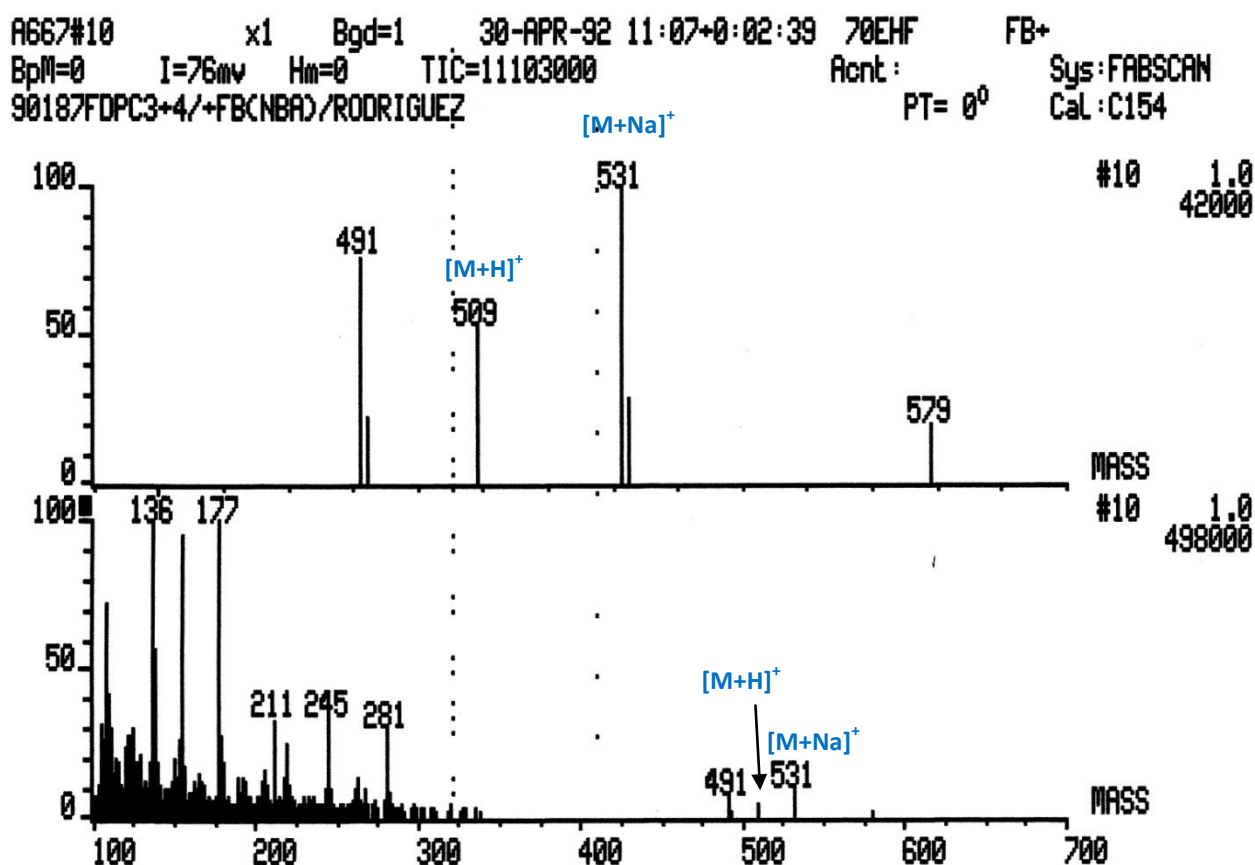


Figura 127. Espectro de masas (+)-FAB de la fracción-mezcla FDF7H2H1.

La presencia del éster mirístico se visualizó además en el RMN de protón al mostrar la señal característica de un triplete a δ_H 0.925 (señalada como ✓ en la Figura 128) correspondiente al metilo terminal de ese ácido graso saturado.

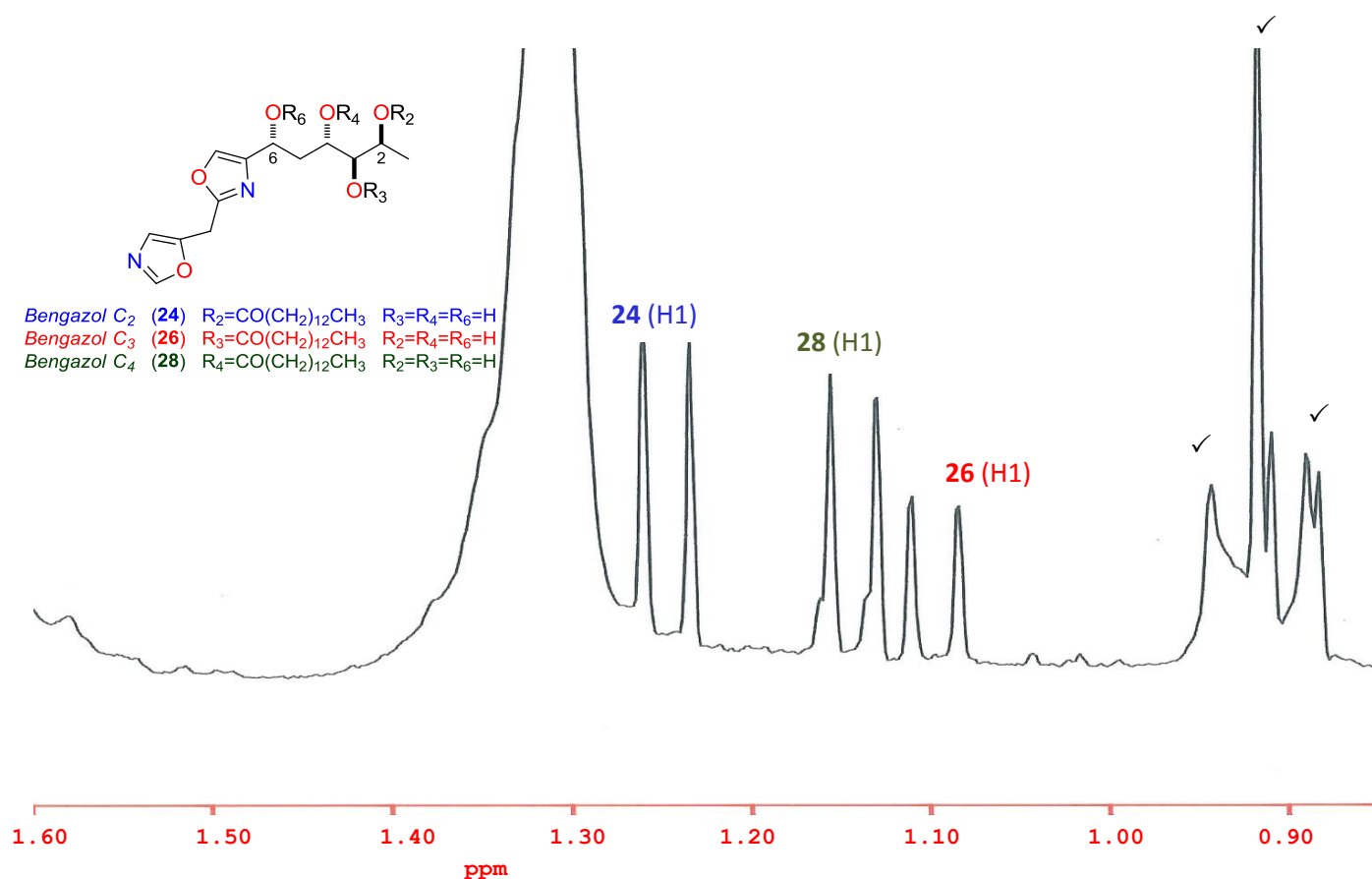


Figura 128. Ampliación del espectro de RMN de ¹H (250 MHz, CD₃OD) de la fracción-mezcla FDF7H2H1

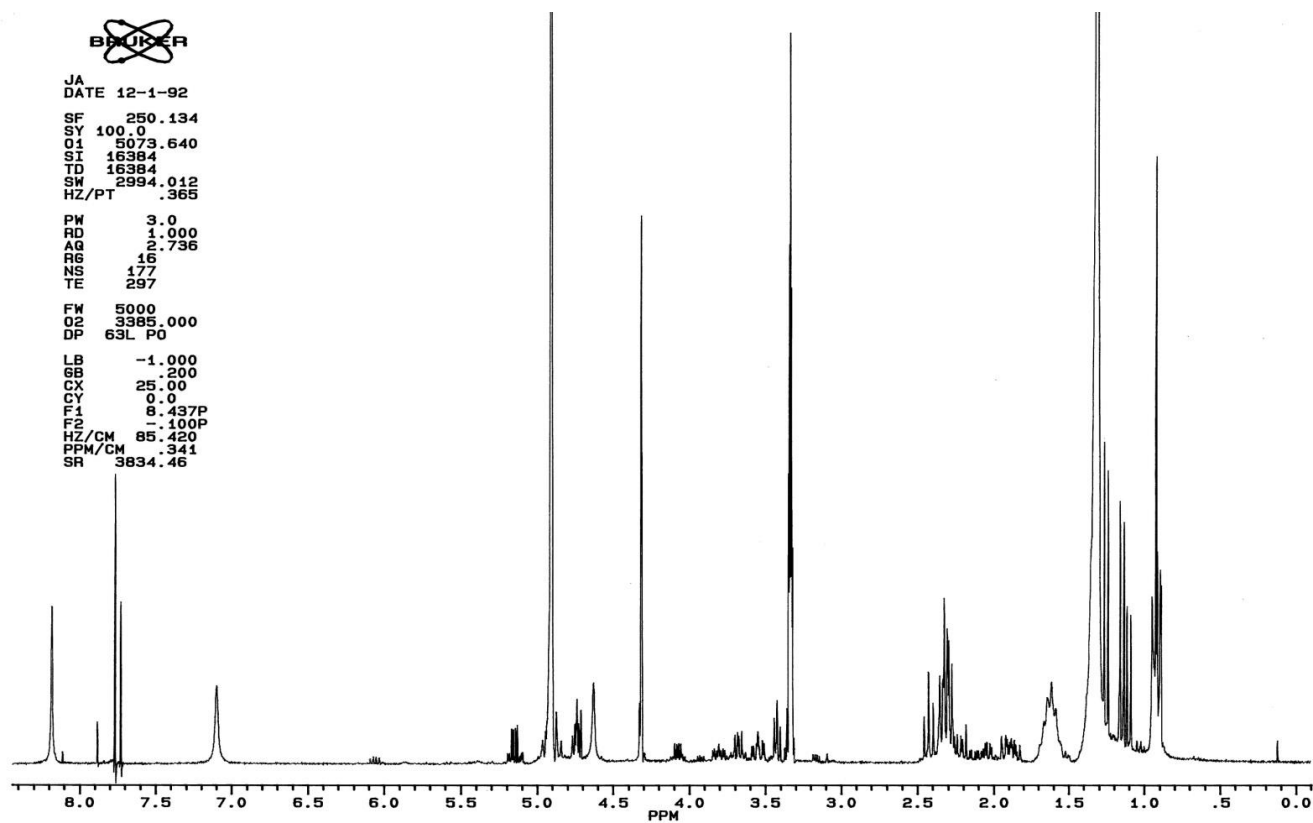


Figura 129. Espectro de RMN de ¹H (250 MHz, CD₃OD) de la fracción-mezcla FDF7H2H1

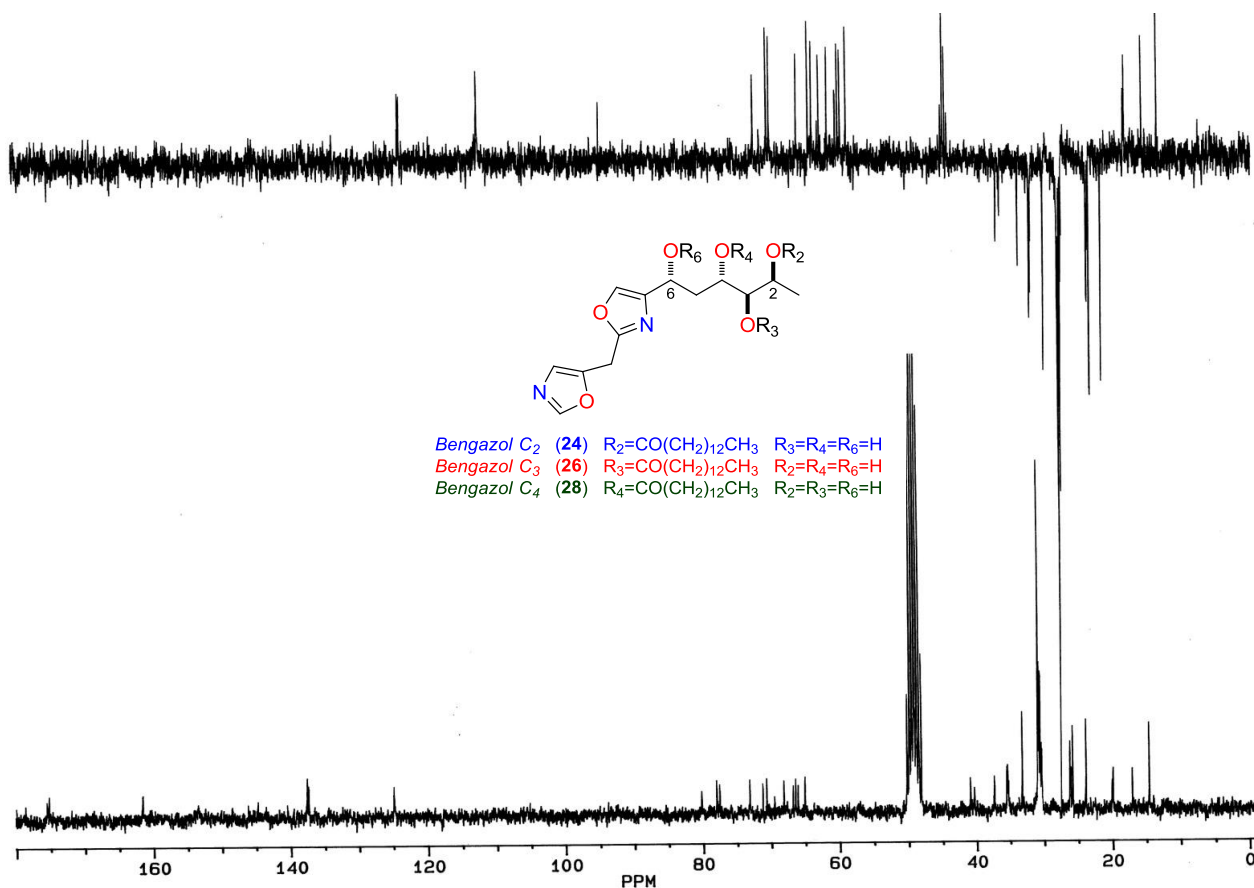


Figura 130. Espectro de RMN de ^{13}C y DEPT-135 (62.3 MHz, CD_3OD) de la mezcla FDF7H2H1.

Como se hizo para la fracción-mezcla 1 descrita anteriormente, para determinar las posiciones esterificadas se estudiaron las correlaciones del espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (Figura 133). La correlación del doblete a δ_{H} 1.10 (perteneciente al metilo H1 del compuesto que hemos denominado **26**) con el protón H2 a δ_{H} 4.07 y este a su vez con el protón H3 a δ_{H} 4.74, claramente desplazado a más ppm con respecto a la misma posición en el bengazol Z (**33**) ($\Delta\delta_{\text{H}} = 1.53$), indicó que C3 es la posición esterificada en **26**. El siguiente compuesto de la fracción-mezcla, numerado como **28**, presentó el protón H1 como un doblete a δ_{H} 1.15 que correlaciona en el espectro COSY con H2 a δ_{H} 3.7 y este, a su vez, con el protón H4 a δ_{H} 4.9. Nuevamente, el desplazamiento a mayor frecuencia de H4 en **28**, en relación con el de bengazol Z (**33**) ($\Delta\delta_{\text{H}} = 1.20$), indicó que la posición esterificada en este compuesto es la C4. Además, también se observaron claramente las correlaciones de H4 con los dos protones diastereotópicos H5a a δ_{H} 2.45 y H5b a δ_{H} 2.00. El último compuesto de esta fracción-mezcla 2 presentó el doblete del metilo H1 a δ_{H} 1.25, que correlaciona con el protón H2 a δ_{H} 5.14, indicando que la posición esterificada es en este caso la C2, coincidiendo por tanto con el bengazol **24**, ya descrito en la mezcla-fracción 1 (FDF7H2H2).

La ausencia de la señal del carbono terciario a δ_{C} 28.1 ppm, característico de ácido 13-metilmirísico, en los espectros de RMN de ^{13}C (Figura 131 y Figura 132) de las fracciones-mezclas FDF7H2H1 y FDF7H2H2, confirmó que solamente el ácido mirísico esterifica a los bengazoles presentes en ellas. Esta señal se observa

claramente en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 136) de la fracción-mezcla 3 (**FDF7H3H2**) que se describe a en las páginas siguientes.

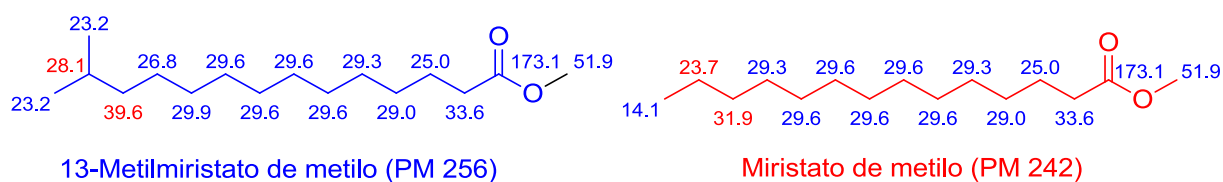


Figura 131. Estructura del miristato de metilo y del 13-metilmiristato de metilo con sus desplazamientos químicos de carbonos.

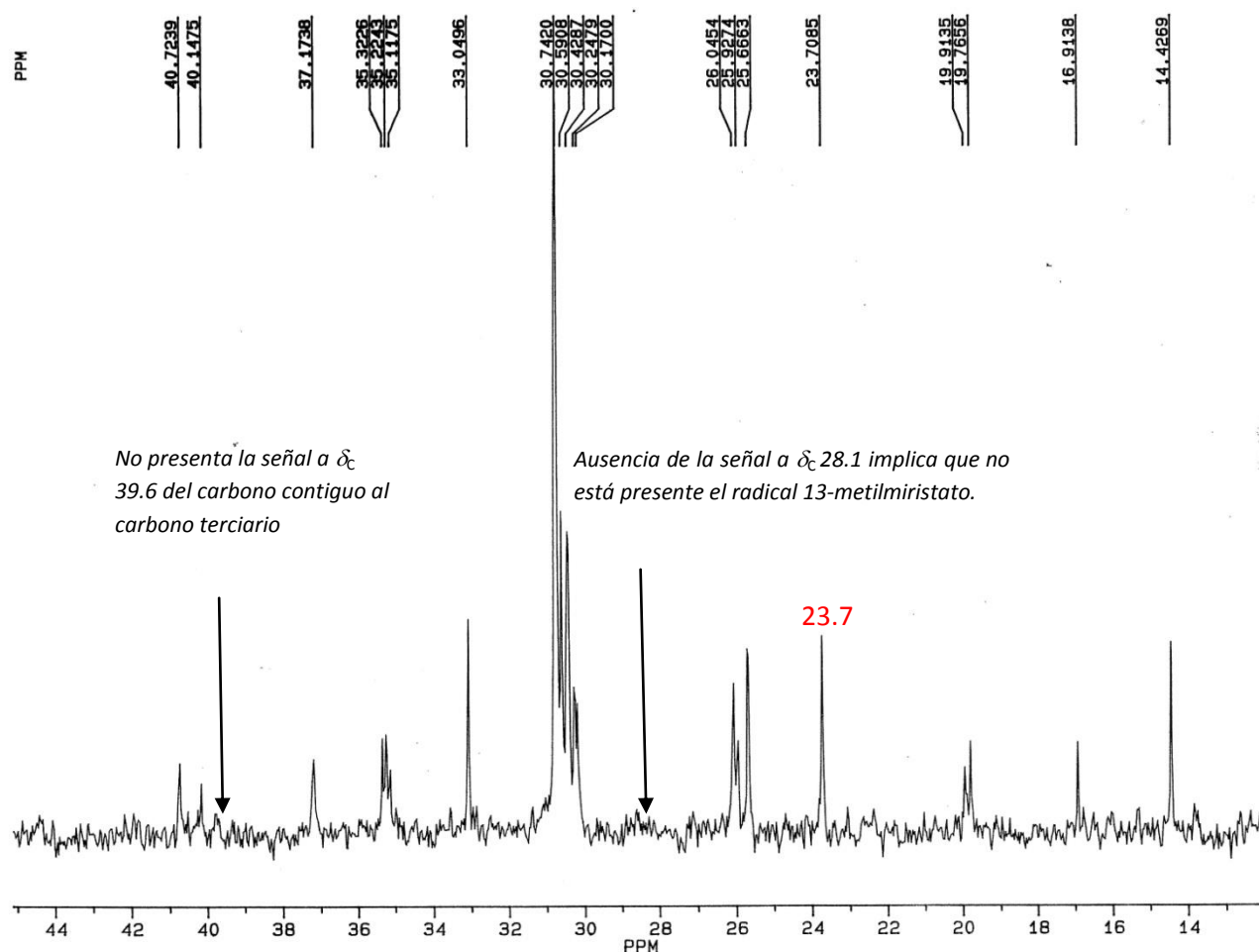


Figura 132. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C (62.3 MHz, Cl_3CD) de la fracción-mezcla **FDF7H2H1**.

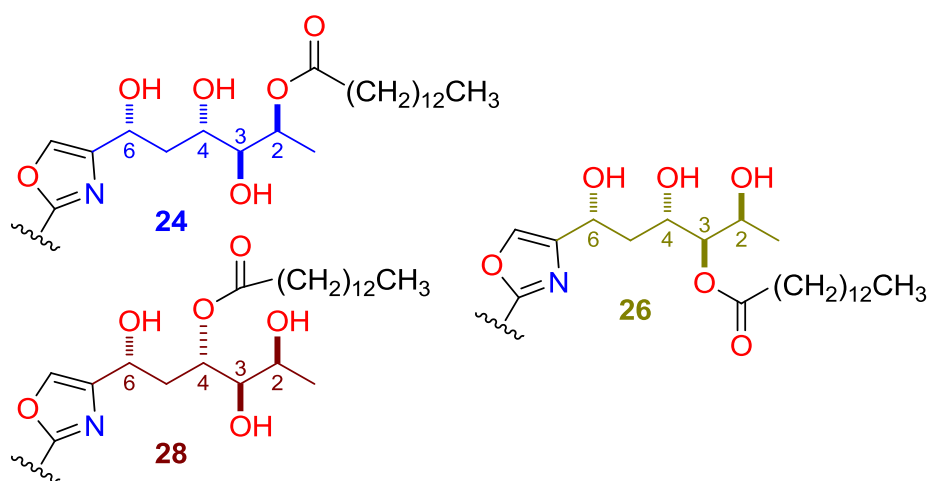
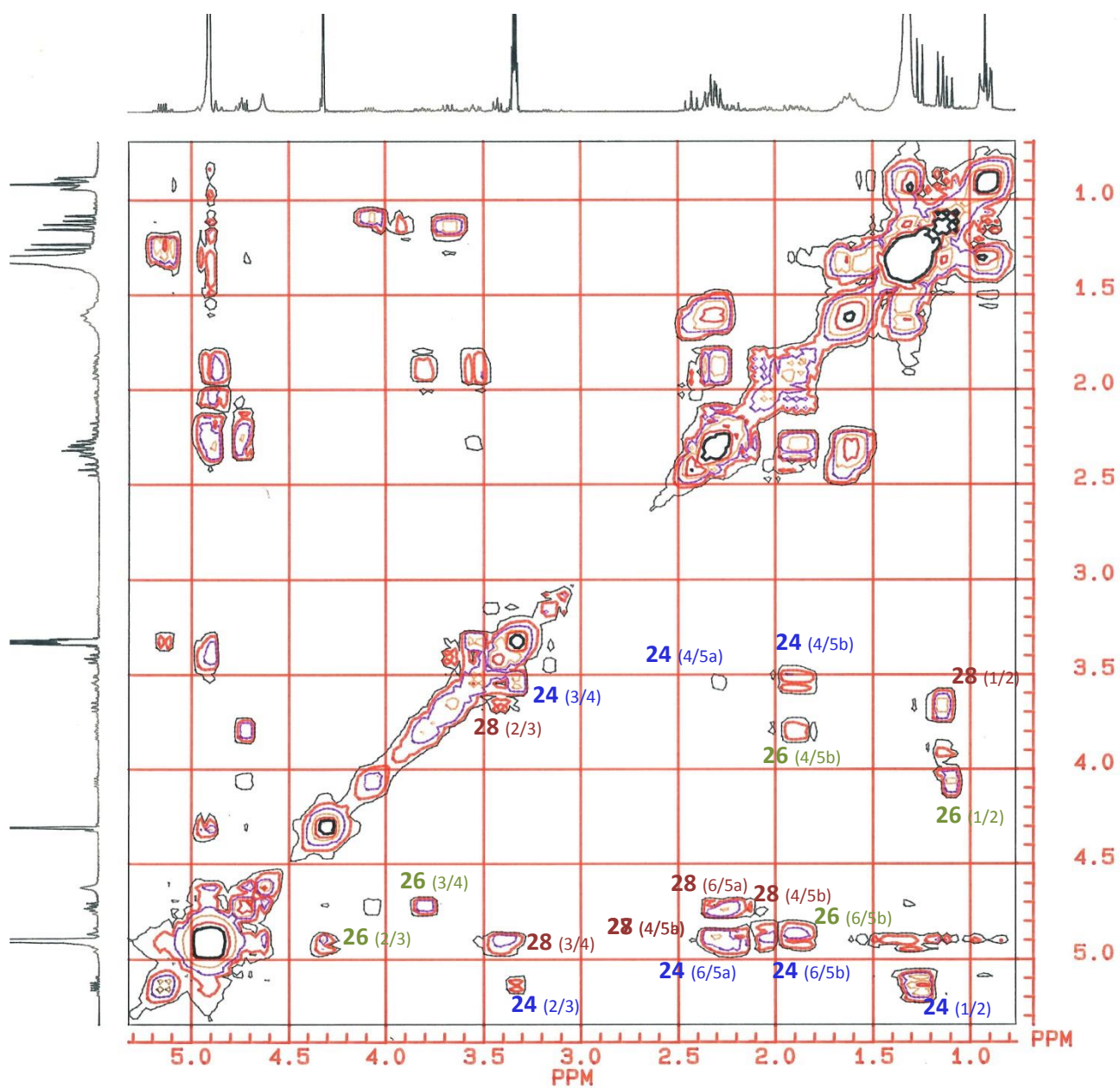
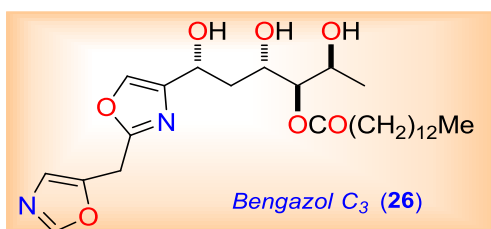


Figura 133. Espectro ^1H - ^1H COSY (250 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla FDF7H2H1.

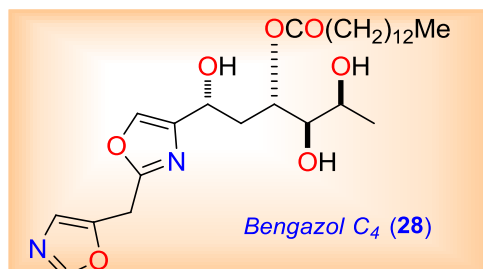
Los compuestos **26** y **28** se denominaron bengazol C₃ y C₄ respectivamente, siendo dos nuevos productos naturales.

Tabla 32. Datos de RMN de ¹H y ¹³C (250 MHz, CD₃OD) de bengazol C₃ (**26**).



Posición	δ_H mult. J (Hz)	δ_C
1	1.10 d 6.5	19.9
2	4.07 dc 6.5, 3.5	66.6
3	4.74 dd 7.1, 3.5	80.0
4	3.80 ddd 10.0, 7.1, 3.4	69.3
5a/5b	2.30 m/1.90 m	40.7
6	4.90 debajo del disolvente	66.2
7		145.1
8	7.76 s	137.2
9		161.4
10	4.31 d 1.0	25.6
11		148.2
12	7.09 sa	124.7
13	8.17 s	153.3

Tabla 33. Datos de RMN de ¹H y ¹³C (250 MHz, CD₃OD) de bengazol C₄ (**28**).



Posición	δ_H mult. J (Hz)	δ_C
1	1.14 d 6.4	16.9
2	3.67 dc 6.4, 5.1	71.0
3	3.42 t 5.1	77.3
4	4.90 debajo del disolvente	70.4
5a/5b	2.42 m/2.02 m	40.7
6	4.90 debajo del disolvente	66.2
7		145.1
8	7.72 s	137.2
9		161.4
10	4.31 d, 1.0	25.6
11		148.2
12	7.09 sa	124.7
13	8.19 s	153.3

III.2.1.2.4.2.3 Fracción-mezcla 3 (FDF7H3H2)

La fracción-mezcla 3 (**FDF7H3H2**) fue la más compleja de las tres, por lo que, como se verá a continuación, resultó ser la más difícil de analizar.

Inicialmente se dedujo que contenía cuatro derivados esterificados del bengazol Z (**33**) debido a que se observaron cuatro dobletes correspondientes a los protones H1, cada uno de ellos a δ_H 1.26, 1.17, 1.16 y 1.12 (ver RMN de 1H en la Figura 134). En este espectro se observó además la presencia de dos tipos de metilo terminales a δ_H 0.92 como un triplete (✓) y a δ_H 0.91 como un doblete (⊗) más intenso. Esta información sugirió que en la mezcla había dos tipos de ésteres, lo cual estaba en concordancia con la presencia en su espectro de masas (+)-FAB de los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ a m/z 509 ($C_{27}H_{44}O_7N_2$) y m/z 523 ($C_{28}H_{46}N_2O_7$). La diferencia de 14 uma es la misma que la que hay entre el ácido mirístico (**A**) y el ácido 13-metilmirístico (**B**).

Todos estos datos indican que los cuatro bengazoles presentes en esta fracción-mezcla se corresponden con alguno de los compuestos hipotéticos **24-30H** mostrados en la Tabla 29, como en las fracciones-mezcla 1 y 2, pero ahora el ácido que esterifica algunos de los hidroxilos de las posiciones 2, 3, 4 ó 6 del bengazol Z (**33**) podría ser tanto el mirístico como el 13-metilmirístico.

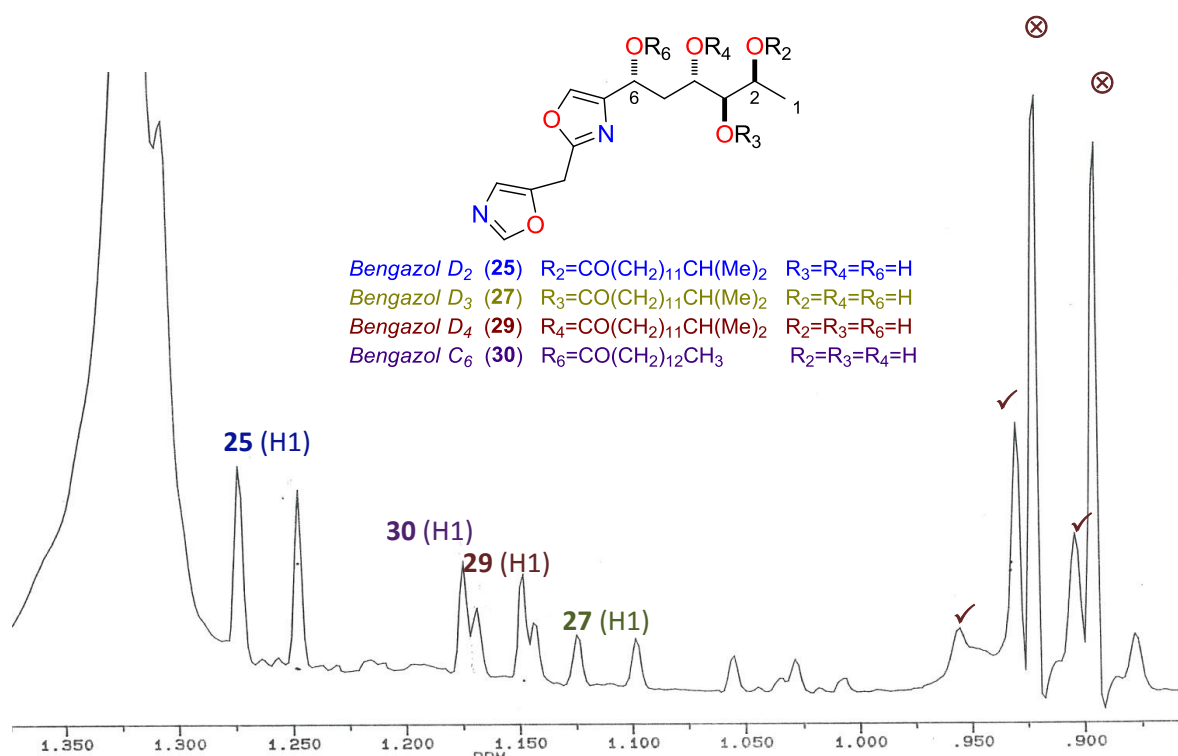


Figura 134. Ampliación del espectro de RMN de 1H (250 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla **FDF7H3H2**

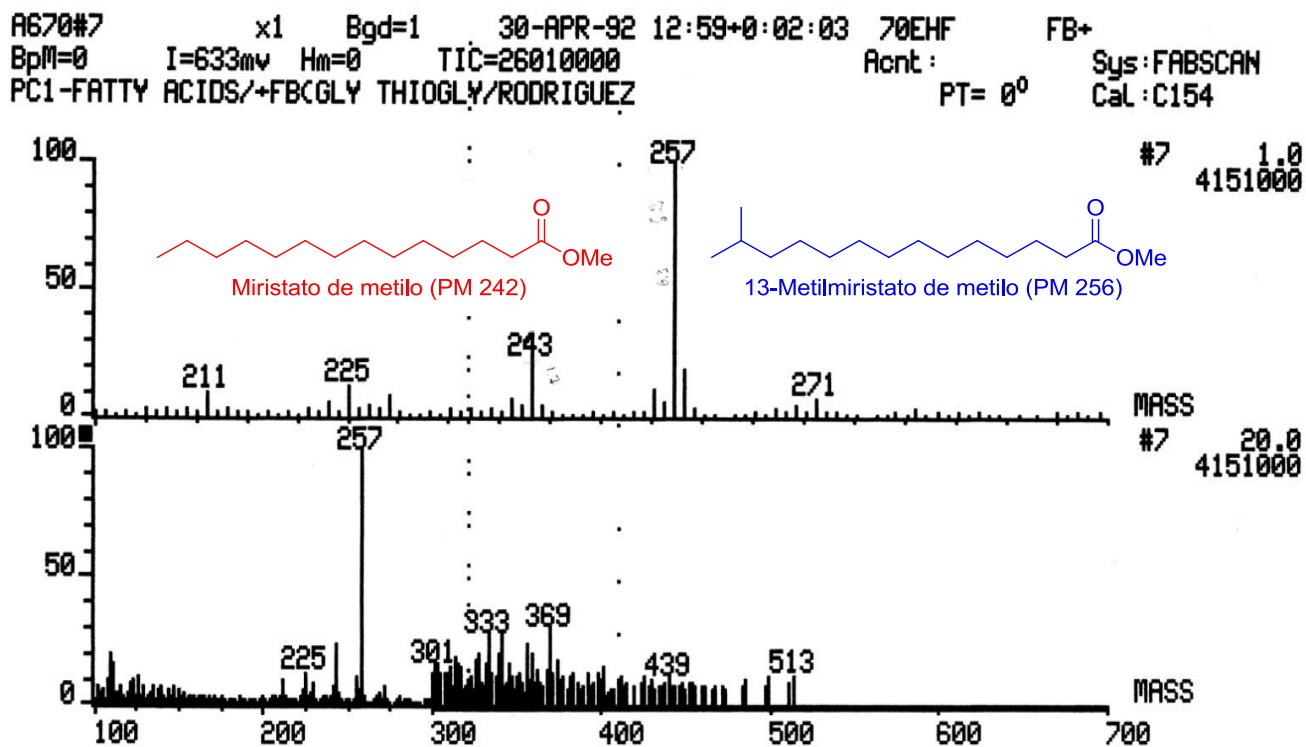


Figura 135. Espectro de masas (+)-FAB del producto de la hidrólisis de la fracción-mezcla FDF7H3H2.

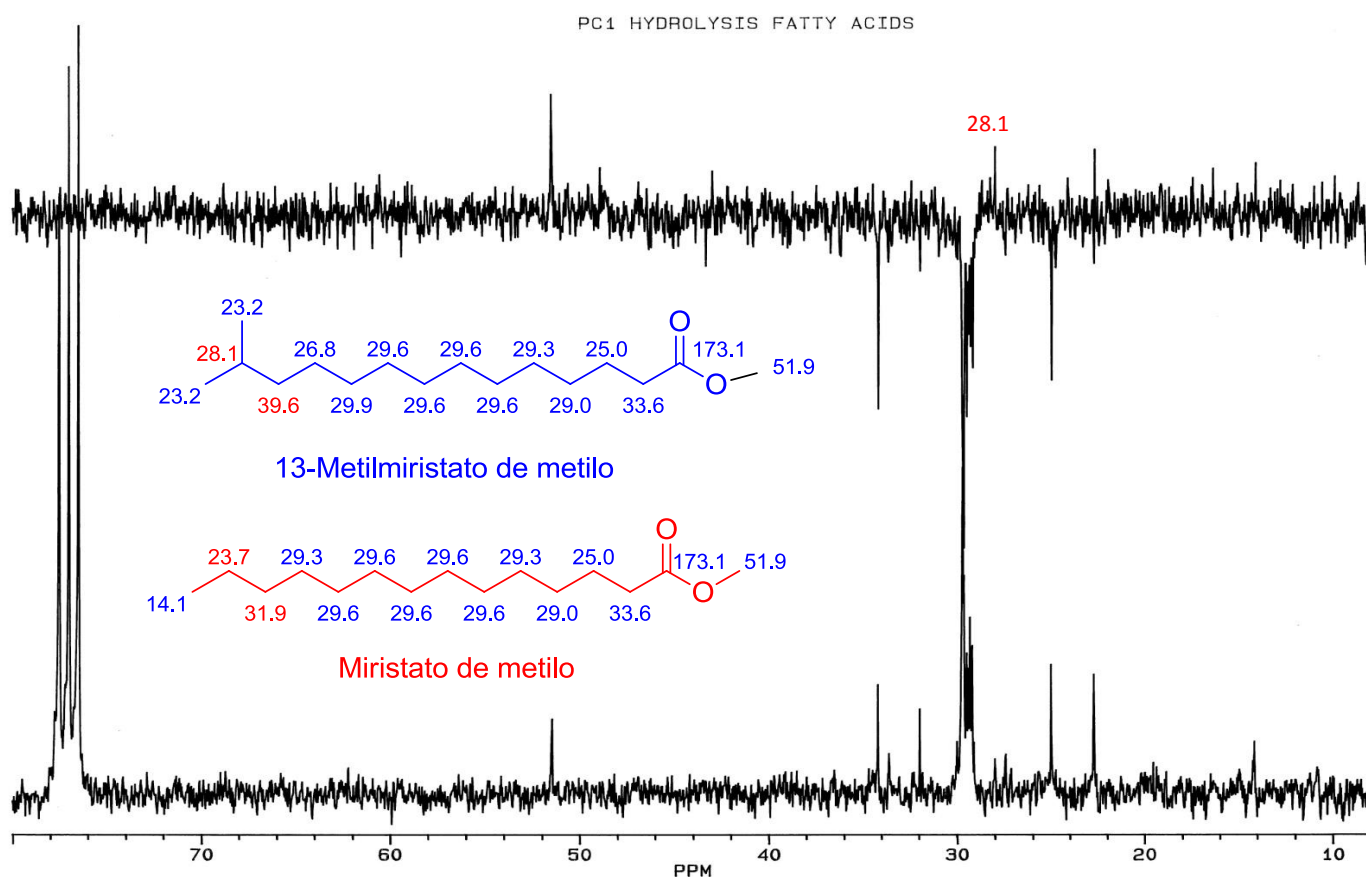


Figura 136: Espectro de RMN de ^{13}C (62.3 MHz, CDCl_3) del producto de la hidrólisis de la fracción-mezcla FDF7H3H2.

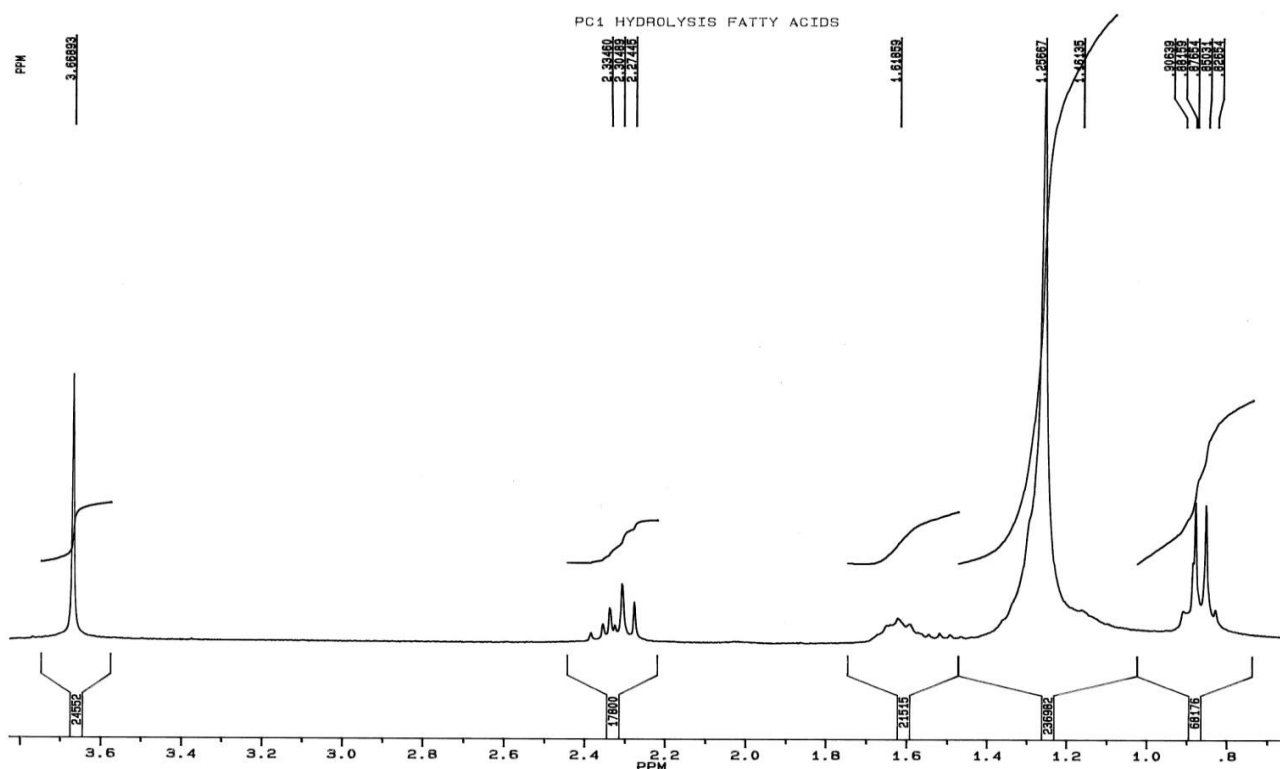
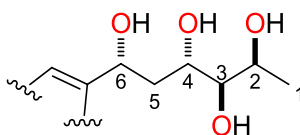


Figura 137. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) del producto de la hidrólisis de la fracción-mezcla FDF7H3H2.

Con el objeto de determinar cuáles son las posiciones esterificadas de cada uno de los cuatro bengazoles, se tomó como referencia el espectro de RMN ^1H (Figura 119) de bengazol Z (**33**), comparándose los desplazamientos químicos de los protones del fragmento C1-C6, deducidos a partir de las correlaciones ^1H - ^1H COSY empezando con cada uno de los protones H1 (ver Figura 139). Las diferencias en dichos desplazamientos químicos se pueden observar en la Tabla 34.

Tabla 34. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones del fragmento C1-C6 de los bengazoles **25**, **27**, **29** y **30**, presentes en la fracción-mezcla FDF7H3H2, con los del bengazol Z (**33**).



33

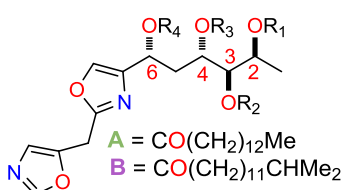
	Bengazol Z (33) δ_{H}	25 δ_{H}	$\Delta\delta_{\text{H}}$	27 δ_{H}	$\Delta\delta_{\text{H}}$	29 δ_{H}	$\Delta\delta_{\text{H}}$	30 δ_{H}	$\Delta\delta_{\text{H}}$
H1	1.19	1.26	0.07	1.12	0.03	1.16	0.03	1.16	0.03
H2	3.98	5.16	1.18	4.08	0.10	3.70	0.28	3.94	0.04
H3	3.21	3.34	0.07	4.73	1.42	3.45	0.24	3.17	0.04
H4	3.70	3.56	0.04	3.80	0.10	4.90	1.20	3.51	0.19
H5a	2.24	2.35	0.11	2.20	0.06	2.40	0.16	2.40	0.16
H5b	1.92	1.88	0.04	1.90	0.02	2.05	0.13	2.00	0.08
H6	4.90	4.90	0	4.90	0	4.90	4.90	6.05	1.15

Las correlaciones observadas en el experimento de ^1H - ^1H COSY de la fracción-mezcla 3 indicaron que los cuatro bengazoles estaban esterificados en algunas de las posiciones 2, 6, 4 y 3. El siguiente paso consistió en deducir en que proporción se encontraban cada uno de los bengazoles en dicha fracción-mezcla. Tal como se hizo anteriormente, a partir de la integración de las señales de los protones del grupo metilo (H1) en su espectro de RMN ^1H se concluyó que se encontraban en una proporción 3.8/2.2/1.2/1.0 (éster en posición 2/éster en posición 6/éster en posición 4/éster en posición 3, respectivamente).

La relación 1.0/2.8 entre los bengazoles que contenían ésteres miristato (**A**) y los que tenían 13-metilmiristato (**B**), se dedujo a partir de la integración de la señal triplete a δ_{H} 0.92 (marcada con la señal ✓), característico del grupo metilo terminal del ácido mirístico, frente a la señal doblete a δ_{H} 0.91 (⊗), correspondiente a los metilos del grupo isopropilo terminal (ver Figura 134). Además en el espectro de masas FAB modo ión positivo del producto resultante de la hidrólisis básica metanólica de esta fracción mezcla **FDF7H3H2** se observaron los dos iones pseudomoleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 243 (éster metílico del ácido mirístico, $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$) y a m/z 257 (éster metílico del ácido 13-metilmirístico, $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$), que estaban en una proporción 1.0/2.9, muy parecida a la deducida anteriormente por RMN de protón.

Una vez calculada la relación de ésteres, el último paso supuso determinar que tipo de éster y en que posición estaba en cada bengazol presente de la mezcla. Para ello, se tuvo en cuenta tanto las proporciones en que se encontraban los cuatro bengazoles (3.8/2.2/1.2/1.0) como la relación 1.0/2.8 (**A/B**) entre los dos tipos de ésteres. De esta forma, se calculó teóricamente como serían las relaciones entre los bengazoles con los ésteres mirístico (**A**) y 13-metilmirístico y (**B**) a partir de las proporciones 3.8/2.2/1.2/1.0 (éster en la posición 2/éster en la posición 6/éster en la posición 4/éster en la posición 3, respectivamente) planteando todas las posibles combinaciones (ver Tabla 35). De todas estas combinaciones, sólo dos se ajustaron a dicha relación 1.0/2.8, la entrada 5, de composición **25, 26, 28 y 30H** (relación calculada **A/B** 1.0/2.71) y la entrada 6, que estaría compuesta por **25, 27, 29 y 30** (relación calculada **A/B** = 1.0/2.73).

Tabla 35. Análisis de las distintas combinaciones de los tipos de cadenas laterales presentes en los cuatro bengazoles de la mezcla-fracción **FDC7H3H2** teniendo en cuenta las áreas relativas del Me-1 para cada bengazol: 3.8/2.2/1.2/1.0.



Entrada	Mezcla hipotética	Posición esterificada				Proporción B/A	B/A
		C-2	C-3	C-4	C-6		
1	24, 27, 29, 30H	A	B	B	B	(1.0+1.2+2.2)/(3.8)	1.15
2	25, 26, 28, 30	B	A	A	A	(3.8)/(1.0+1.2+2.2)	0.86
3	25, 26, 29, 30	B	A	B	A	(3.8+1.2)/(1.0+2.2)	1.36
4	25, 27, 28, 30	B	B	A	A	(3.8+1.0)/(1.2+2.2)	1.71
5	25, 26, 28, 30H	B	A	A	B	(3.8+2.2)/(1.0+1.2)	2.71
6	25, 27, 29, 30	B	B	B	A	(3.8+1.0+1.2)/(2.2)	2.73
7	25, 27, 28, 30H	B	B	A	B	(3.8+1.0+2.2)/(1.2)	5.83
8	25, 26, 29, 30H	B	A	B	B	(3.8+1.2+2.2)/(1.0)	7.20

Para deducir finalmente cual de las dos combinaciones era la correcta, se tuvo en cuenta que la entrada **5** de combinación de bengazoles D_2 (**25**), C_3 (**26**), C_4 (**28**) y C_6 (**30H**) no sería posible, ya que los bengazoles C_3 (**26**) y C_4 (**28**) tuvieron que haber salido anteriormente en un pico cromatográfico diferente porque tienen un t_R bastante menor (Figura 138) y por tanto, no podrían estar presentes de nuevo en esta fracción-mezcla. De esta forma la mezcla debería estar compuesta por los bengazoles D_2 (**25**), D_3 (**27**), D_4 (**29**), C_6 (**30**).

Se concluyó entonces que la combinación correcta en la fracción-mezcla 3 era la correspondiente a la entrada 6 compuesta por **25**, **27**, **29** y **30**. La presencia del bengazol C_6 (**30**) tanto en la fracción-mezcla 2 (**FDF7H2H2**) como en la 3 (**FDF7H3H2**) se puede explicar por el solapamiento de los picos cromatográficos correspondientes a estas dos fracciones-mezcla. Se propone por tanto que el orden de tiempos de retención de menor a mayor de cada uno de los bengazoles sería el siguiente: los compuestos **26**, **28** y **24** en la fracción-mezcla **FDF7H2H1**, los compuestos **24** y **30** en la fracción-mezcla **FDF7H2H2** y por último los compuestos **30**, **25**, **27** y **29** en la **FDF7H3H2** (ver Figura 138).

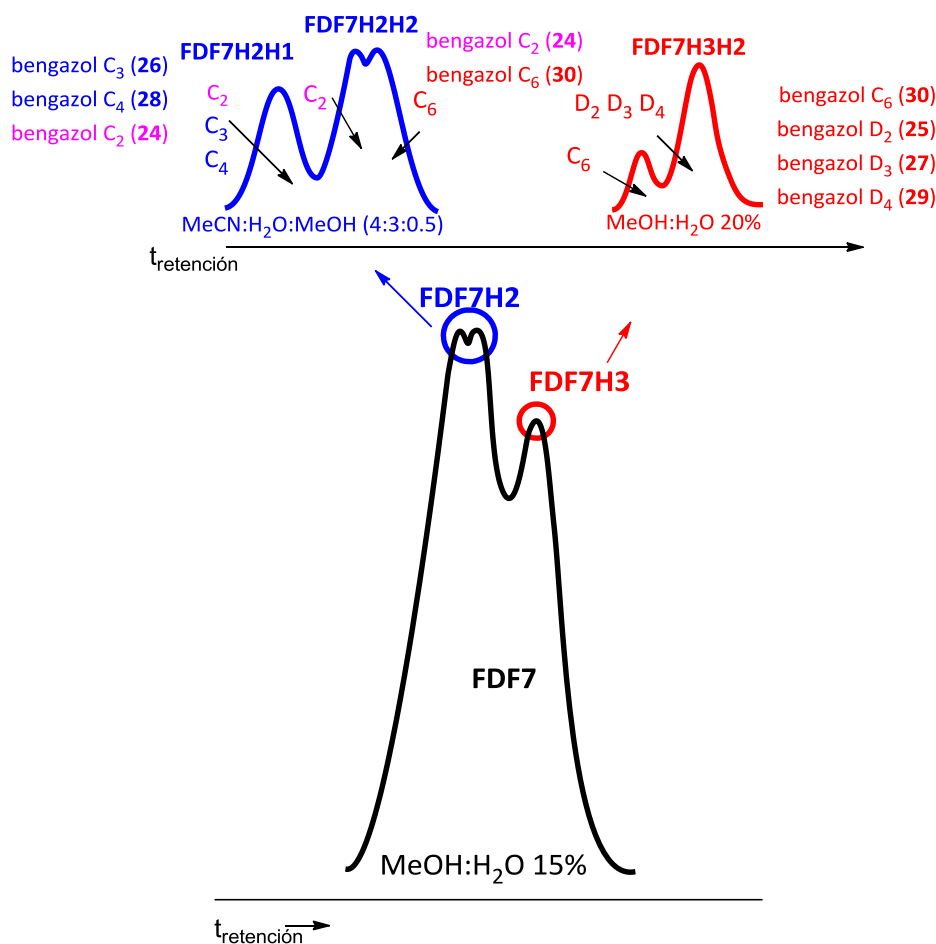


Figura 138. Cromatogramas de HPLC de las mezclas de bengazoles

Por tanto, en esta fracción-mezcla se determinaron tres nuevos productos naturales que se nombraron como bengazol D_2 (**25**), bengazol D_3 (**27**), bengazol D_4 (**29**), además de bengazol C_6 (**30**) que fue descrito en la anterior mezcla (Tabla 31).

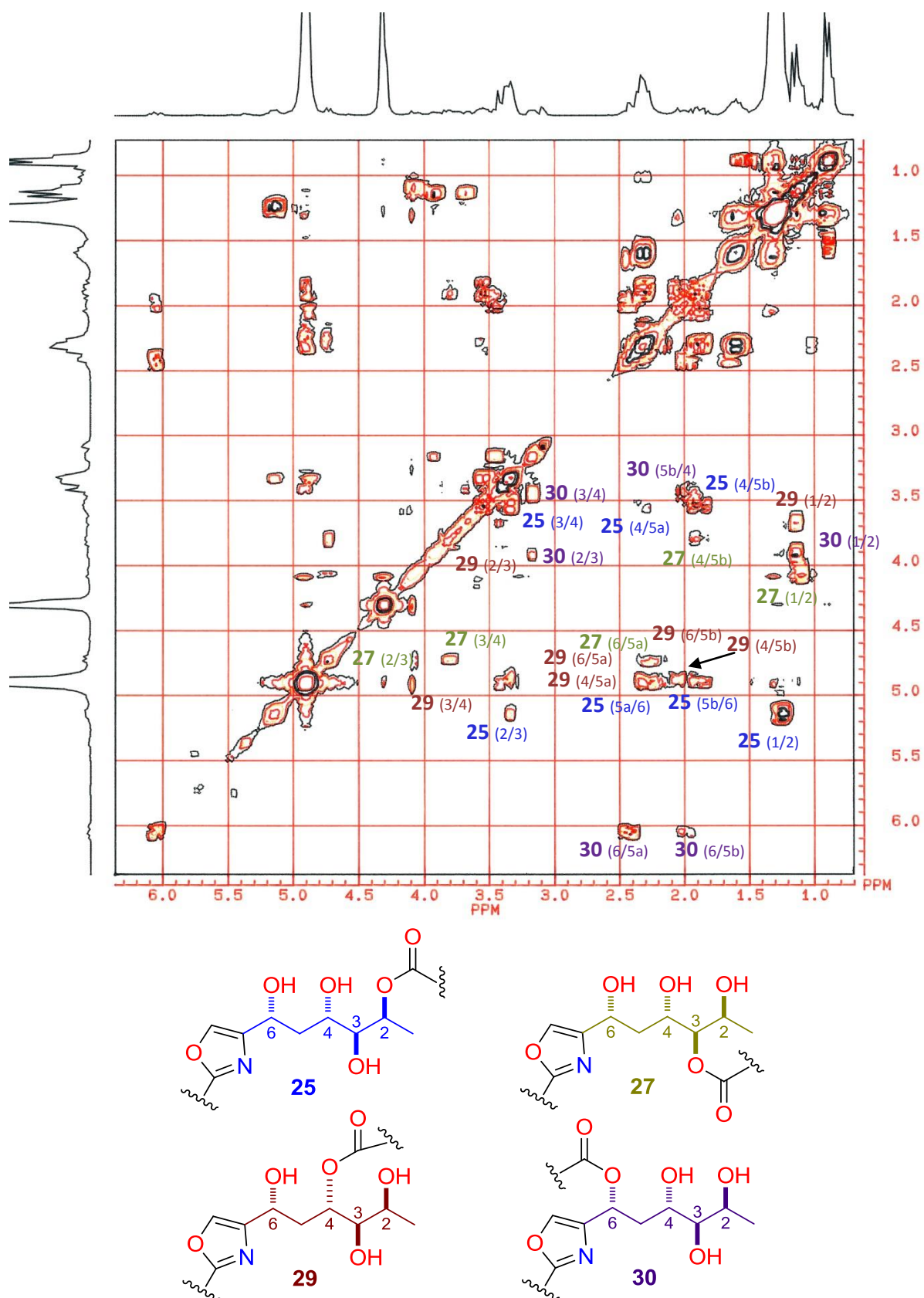


Figura 139. Espectro de ^1H - ^1H COSY (250 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla FDF7H3H2.

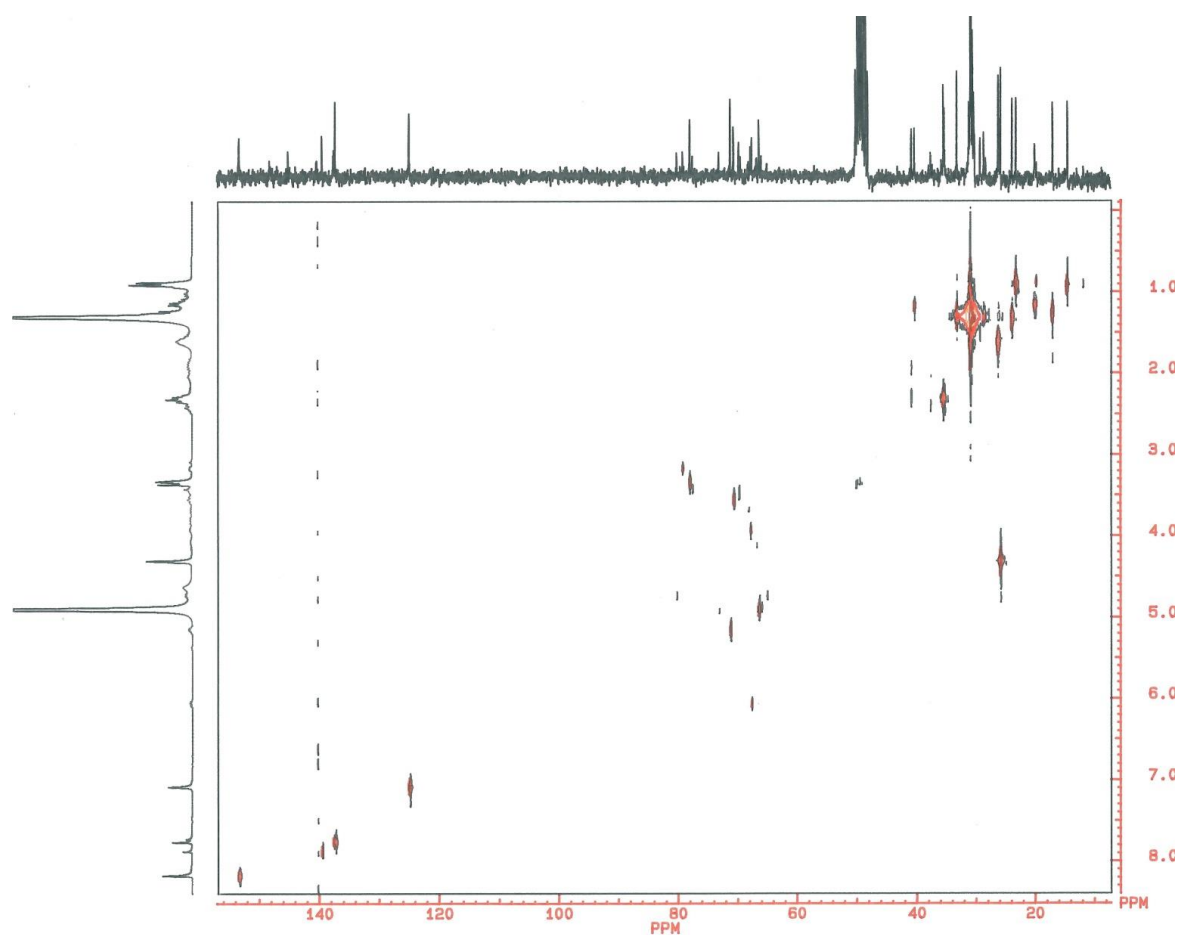


Figura 140. Experimento ^1H - ^{13}C HETCOR ($J=145$ Hz) (250 MHz, CD_3OD) de la la fracción-mezcla mezcla **FDF7H3H2**.

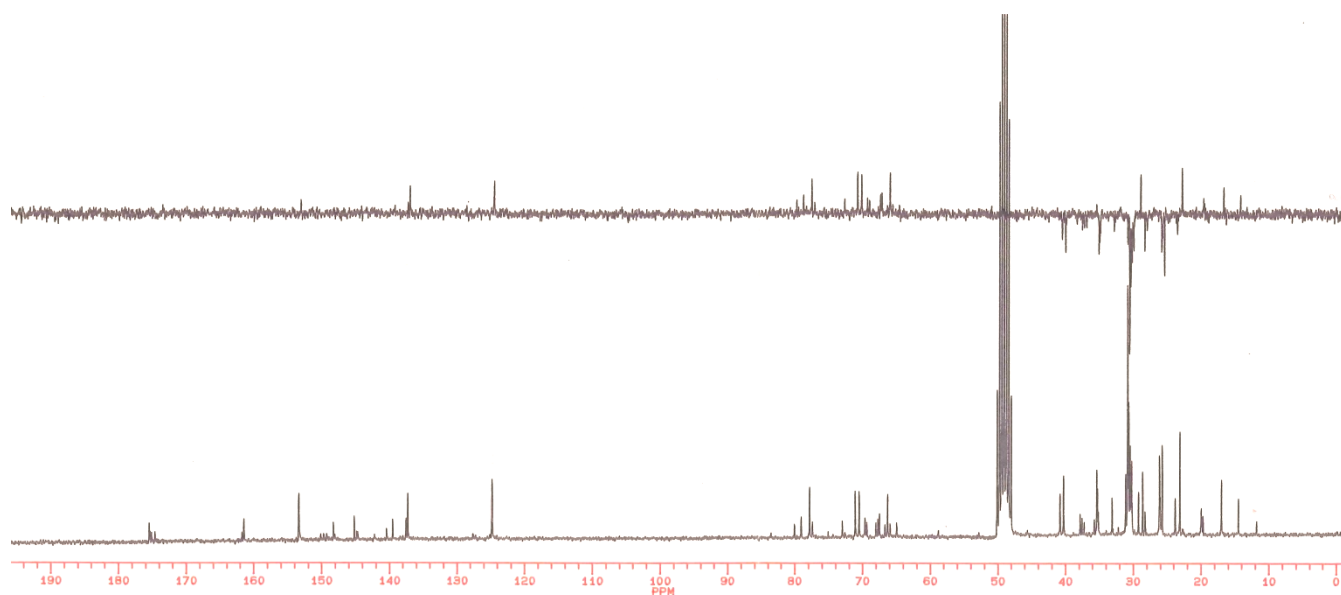


Figura 141. Experimento de RMN de ^{13}C y DEPT-135 (62.3 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla mezcla **FDF7H3H2**.

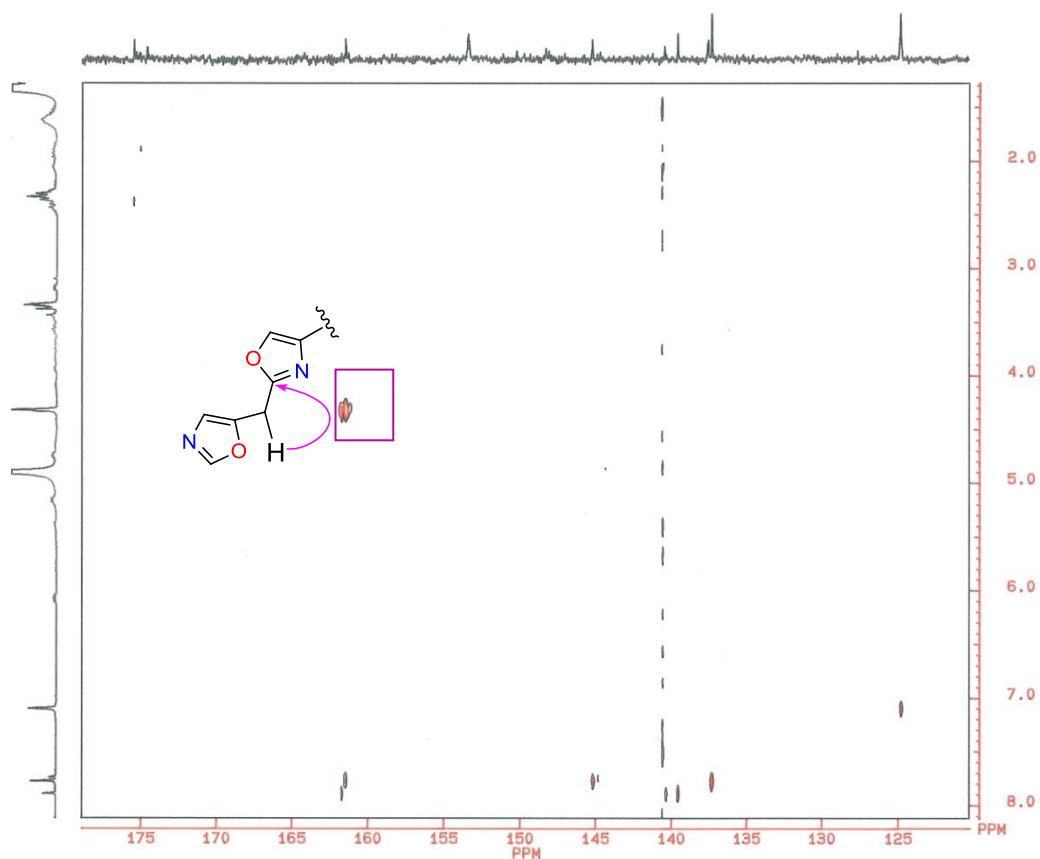
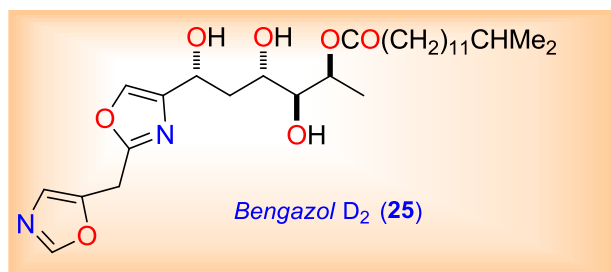


Figura 142. Ampliación del experimento ^1H - ^{13}C HETCOR ($J = 9\text{ Hz}$) (250 MHz, CD_3OD) de la fracción-mezcla FDF7H3H2 y correlación clave.

Tabla 36. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (250 MHz, CD_3OD) del compuesto bengazol D_2 (25).



Posición	δ_{H} mult. J (en Hz)	δ_{C}
1	1.26 d 6.5	16.9
2	5.16 dc 6.5 Hz y 2.7	71.0
3	3.34 debajo del disolvente	77.3
4	3.56 ddd 9.7 Hz y 2.7	70.4
5a/5b	2.35 m/1.88 m	40.7
6	4.90 debajo del disolvente	66.2
7		145.1
8	7.77 s	137.2
9		161.4
10	4.32 d 1.0 Hz	25.6
11		148.2
12	7.10 sa	124.7
13	8.19 s	153.3

Tabla 39. Datos de RMN (250 MHz, CD₃OD) del grupo miristato en las mezclas 1, 2 y 3.

Posición	δ_H mult. <i>J</i> (en Hz)	δ_C
14		175.3
15	2.38 t 7.5	35.7
16	1.60 m 5.1	25.7
17-24	1.30 m	30.0
25	1.30 m	33.1
26	1.30 m	23.7
27	0.90 t 7.5	14.0

Tabla 40. Datos de RMN (250 MHz, CD₃OD) del grupo 13-metilmiristato en la mezcla 3.

Posición	δ_H mult. <i>J</i> (en Hz)	δ_C
CO-Miristato		175.4
CH₂CO-Miristato	2.38 t 7.5	35.8
16	1.60 m 5.1	25.7
17-22	1.30 m	30.0
23	1.30 m	28.5
25	1.30 m	40.2
26	1.30 m	29.1
27-28	0.90 t 6.6	23.0

III.2.1.2.5 Actividad biológica

Los bengazoles A (**31**) y B (**32**) y bengazol Z (**33**) fueron evaluados en el panel de las 60 líneas celulares del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU (NCI). Bengazol A (**30**) mostró una actividad muy potente frente a células tumorales de colon COLO-205 [GI₅₀=0.181 μ M (0.085 μ g/ml), TGI=1.5 μ M, LC₅₀=5.25 μ M] y melanoma SKMEL-5, [GI₅₀=1.13 μ M, TGI=4.83 μ M, LC₅₀=4.83 pM (4)].³⁹⁴ En contraste, el compuesto de hidrólisis, bengazol Z (**33**), fue inactivo frente a todas las líneas celulares ensayadas.

En el año 2011 Motti y colaboradores publicaron que los bengazoles C₄ (**28**) y C₆ (**30**) muestran una importante actividad citotóxica frente a varias líneas tumorales, siendo muy baja para bengazol Z (**33**) Tabla 41.³⁹⁵

Tabla 41. Datos de citotoxicidad GI₅₀ en μ g/mL de los compuestos **28**, **30** y **33** (datos tomados de la referencia 395).

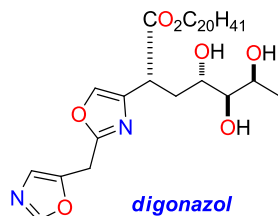
Compuesto	SF-268 ^a	MCF-7 ^b	H460 ^c	HT-29 ^d	CHO-K1 ^e
33	22	18	8	13	94
28	0.3	0.8	0.1	0.6	1.2
30	0.02	0.06	<0.02	0.1	0.8

^aGlioblastoma de células del sistema nervioso central. ^bCélulas de adenocarcinoma de efusión mama-pleural. ^cCélulas grandes de carcinoma de pulmón. ^dHT-29 Células de adenocarcinoma colo-rectal. ^eCélulas de ovario de hamster chino.

³⁹⁵ Ovenden S. P. B., Nielson J. L., Liptrot C. H., Willis R. H., Tapiolas D. M., Wright A. D., Motti C. A. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 2469

III.2.1.2.6 Otros bengazoles aislados posteriormente a este trabajo

Posteriormente a la publicación de estos resultados,³⁹⁶ el grupo de investigación del Profesor Kashman (Universidad de Tel Aviv) en Israel, publicó el aislamiento de un nuevo análogo de bengazol C₆ (**30**), al que denominó digonazol, en el que el OH en C6 está esterificado por un ácido graso saturado de 20 átomos de carbono.³⁹⁷



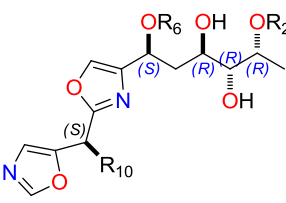
En años posteriores, otros grupos de investigación publicaron nuevos análogos de los bengazoles descritos anteriormente, los bengazoles C-G y los bengazoles 1-6, cuyas estructuras se muestran en la Tabla 42.³⁹⁸

³⁹⁶ Rodríguez J., Nieto, R. M. Crews, P. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 6, 2034-2040. Número de citaciones a 10 de mayo de 2013: **48**.

³⁹⁷ Rudi, A., Kashman Y. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 6, 829.

³⁹⁸ (a) Searle, P. A., Richter, R. K., Molinski, T. F. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 4073. (b) Fernández, R., Dherbomez, M., Letourneux, Y., Nabil, M., Verbist, J. F., Biard, J. F. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 678.

Tabla 42. Estructuras de los nuevos bengazoles aislados de esponjas del género *Jaspis* descritas posteriormente a este trabajo.

	R_2	R_6	R_{10}	Actividad	Ref
Bengazol C (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)	H	H	Mezcla de OCO(CH ₂) ₁₁ CH(Me) ₂ OCO(CH ₂) ₁₀ CH(Me)CH ₂ Me	antifúngico 9-10.5 mm 0.5 µg/disco	398(a)
Bengazol D (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)	H	H	OCO(CH ₂) ₁₀ CH(Me) ₂	antifúngico 9-10.5 mm 0.5 µg/disk.	398(a)
Bengazol E (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)	H	H	OCO(CH ₂) ₁₃ Me	Antifúngico 9-10.5 mm 0.5 µg/disco (1 mg/mL) antifúngico (0.3 mg/mL) <i>S.carlsbergensis</i> >100 mg/mL.	398(a)
Bengazol F (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)	H	H	OCO(CH ₂) ₁₁ CH(Me)CH ₂ Me	antifúngico (9-10.5 mm 0.5 µg/disk).	398(a)
Bengazol G (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)	H	H	OCO(CH ₂) ₁₄ Me	antifúngico (9-10.5 mm 0.5 µg/disk).	398(a)
Bengazol 1 (2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *)	CO(CH ₂) ₁₄ Me	H	H	antifúngico (0.8 a 1.5 µg/mL)	398(b)
Bengazol 2 (2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *)	H	CO(CH ₂) ₁₄ Me	H	antifúngico (0.8 ta1.5 µg/mL)	398(b)
Bengazol 3 (2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *)	CO(CH ₂) ₁₂ CH(Me) ₂	H	H	antifúngico (0.8 a 1.5 µg/mL)	398(b)
Bengazol 4 (2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *)	H	CO(CH ₂) ₁₂ CH(Me) ₂	H	antifúngico (0.8 a 1.5 µg/mL),	398(b)
Bengazol 5 (2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *)	CO(CH ₂) ₁₃ Me	H	H	antifúngico (0.8 a 1.5 µg/mL)	398(b)
Bengazol 6 (2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *)	H	CO(CH ₂) ₁₃ Me	H	antifúngico (0.8 a 1.5 µg/mL)	398(b)



III.2.2 Estudio de las ascidias *Aplidium falklandicum* y *Aplidium meridianum* mediante LC-MS

III.2.2.1 Antecedentes bibliográficos

Las ascidias también conocidas como tunicados, son organismos marinos que pertenecen a la clase *Ascidaceae* presentes en todos los océanos, con más de 2800 especies descritas.³⁹⁹ Pueden vivir solitarios o constituir grupos sociales de individuos unidos por la base (coloniales), con muchos zooides integrados en una matriz gelatinosa compartiendo un manto externo.⁴⁰⁰ Este tejido externo abriga diversos tipos de células, incluyendo en algunos casos, simbioses, es multifuncional, su consistencia es variable y puede ser gelatinoso o correoso.⁴⁰¹ Los tunicados no se desplazan, se fijan a las rocas o conchas. Se conocen como sifones marinos ya que se alimentan filtrando el agua por la faringe y la expulsan en forma de chorro.

Muchos depredadores se alimentan de ascidias, por eso necesitan desarrollar mecanismos de defensa para no ser comidos. Hay varios mecanismos tanto físicos como químicos que pueden desarrollar en el manto que cubre estos organismos. Con respecto a mecanismos físicos, puede ocurrir que el manto que los rodea esté endurecido. Aunque esto se ha observado en algunas colonias, generalmente suele presentarse en individuos solitarios, exhibiendo en su tejido celular unas espículas de carbonato cálcico que puede evitar la ingesta por otros organismos.⁴⁰² Pero su mecanismo de defensa más importante es de naturaleza química, implicando la acumulación de metales pesados como vanadio, de ácido sulfúrico o clorhídrico en la vesícula biliar de las células del manto⁴⁰³ y el empleo de productos naturales.

Se ha observado que los tunicados en colonias suelen mantener su manto libre de otros organismos, debido probablemente a la producción de sustancias con propiedades antiincrustantes. Sin embargo, se encuentran individuos solitarios que están cubiertos de otros organismos con el fin de camuflarse de sus depredadores.^{399,403,404}

En 1974, Fenical aisló el primer metabolito bioactivo de una ascidia, la hidroquinona geranilo de *Aplidium* sp. Desde entonces, los tunicados han sido objeto de numerosos estudios lográndose aislar un gran número de compuestos bioactivos de notable interés, destacando el primer producto natural de origen marino sometido a ensayos clínicos en humanos, didemnina B.⁴⁰⁵

La mayoría de los compuestos aislados poseen estructuras de naturaleza peptídica que contienen heterociclos aromáticos con nitrógeno, aunque también se aislaron en menor número compuestos no nitrogenados, tales como lactonas, terpenoides o quinonas.^{405,406} Aunque la función ecológica de la mayor parte de esos metabolitos se desconoce, se ha demostrado en algunos casos que se emplean para disuadir a los depredadores⁴⁰⁷ y como antiincrustantes.⁴⁰⁸

³⁹⁹ Lambert G. *Can. J. Zool.* **2005**, 83, 34.

⁴⁰⁰ Brusca R.C., Brusca, G.J. *Invertebrates*, 2nd ed., Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA, **2003**, p. 895.

⁴⁰¹ Hirose E. *Invertebr. Biol.* **2009**, 128, 83.

⁴⁰² a) Lambert G. *Biol. Bull.* **1979**, 157, 464. b) Lambert G., Lambert C.C. *Acta Zool.* **1997**, 78, 51.

⁴⁰³ a) Stoecker, D. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1980**, 3, 257. b) Stoecker, D. *Ecology* **1980**, 61, 1327. c) Pisut D. P., Pawlik, J.R. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2002**, 270, 203. d) McClintock J.B., Amsler M.O., Amsler C.D., Southworth K.J., Petrie C., Baker B.J. *Mar. Biol. (Berl.)* **2004**, 145, 885.

⁴⁰⁴ Bryan P.J., McClintock J.B., Slattery M., Rittschof D.P. *Biofouling* **2003**, 19, 235.

⁴⁰⁵ Davidson, B.S. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1771.

⁴⁰⁶ Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G., Prinsep M.R. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 144.

⁴⁰⁷ López-Legentil S., Turón X., Schupp P. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2006**, 332, 27.

A continuación se muestra en la Tabla 43 las especies estudiadas de ascidias del género *Aplidium*, con los tipos de compuestos que se han aislado de ellas y la actividad farmacológica que presentan.

Tabla 43. Especies estudiadas del género *Aplidium* y compuestos aislados.

<i>Especie</i>	Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Localización	Actividad	Ref.
<i>A. conicum</i>	Conicamin	Indol	Mediterráneo España	Antagonista de histamina	⁴⁰⁹
<i>A. cyaneum</i>	Aplicianinas A-F	Indol	Mar de Weddell Antártida	Citotóxica	⁴¹⁰
<i>A. haouarianum</i>	Haouaminas A y B	Alcaloide	Isla de Tarifa España	Citotóxica	⁴¹¹
<i>A. meridianum</i>	Meridianinas A-G	Indol	Isla Sur Georgia	Citotóxica	⁴¹²
<i>A. pantherinum</i>	Pantherinina	Tetracíclico	Australia	Citotóxica	⁴¹³
<i>A. tabascum</i>	Lepadinas F, G, H	Decahidrocalina	Gran Barrera Australia	Antiplasmodial y antitripanosomal	⁴¹⁴
<i>A. uouo</i>	Uouaminas A, B	Piperidinas	Maui Hawái		⁴¹⁵
<i>Aplidium sp.</i>	Apliditas A-G	Macrólidos	Australia	Citotóxica	⁴¹⁶
<i>Aplidium sp1 y sp2</i>	3 compuestos	Iodados	Australia	Citotóxica	⁴¹⁷

Las estructuras de algunos compuestos aislados de *Aplidium* se muestran a continuación:

⁴⁰⁸ Davis A.R., Bremner J.B. Potencial Antifouling Natural Products from Ascidians: A Review. In *Marine Biotechnology*, Fingerman M., Nagabhushanam R., Thompson M.-F., Eds., Science Publishers: Washington, DC, USA, **1999**, Volume 3.

⁴⁰⁹ Aiello A., Borrelli F., Capasso R., Fattorusso E., Luciano P., Menna M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4481.

⁴¹⁰ Reyes F., Fernández R., Rodríguez A., Francesch A., Taboada S., Avila C. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5119.

⁴¹¹ Garrido L., Zubía E., Ortega M. J., Salva J. J. *Org. Chem.* **2003** 68, 293.

⁴¹² Hernández F. L., Bal de Kier J. E., Puricelli L., Tatián M., Seldes A. M., Palermo J. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1130.

⁴¹³ Kim J., Pordesimo E. O., Toth S. I., Schmitz F. J., Vanaltena I. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 1813.

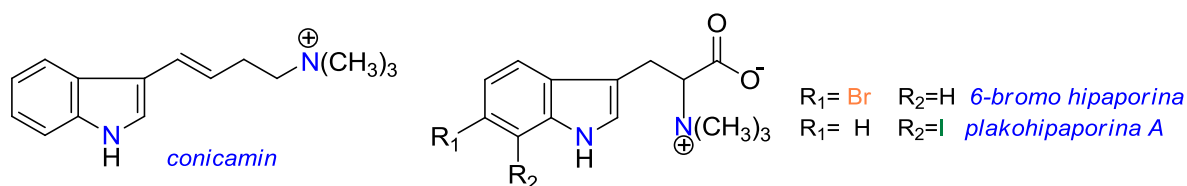
⁴¹⁴ Davis R. A., Carroll A. R., Quinn R. J. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 454.

⁴¹⁵ McCoy M. C., Faulkner D. J. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1087.

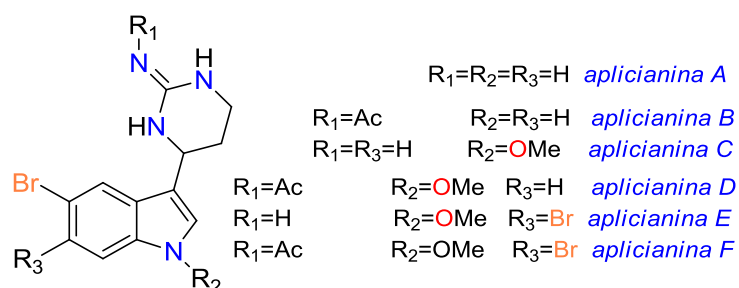
⁴¹⁶ Murray L., Lim T. K., Currie G., Capon R. J. *Aust. J. Chem.* **1995**, 48, 1253.

⁴¹⁷ Carroll A. R., Bowden B. F., Coll J. C. *Aust. J. Chem.* **1993**, 46, 825.

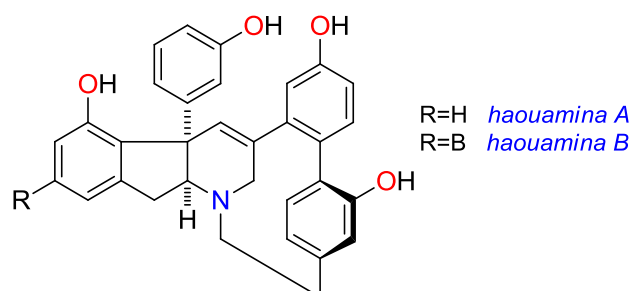
Aplidium conicum:



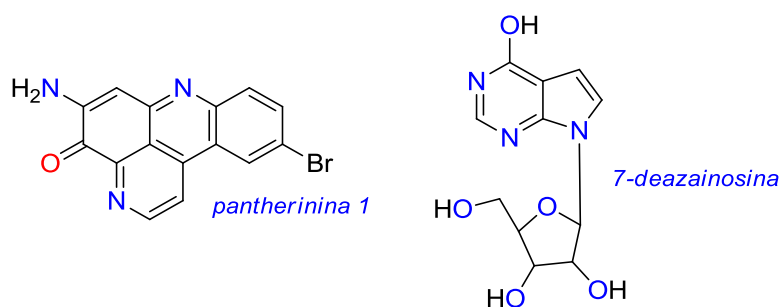
Aplidium cyaneum



Aplidium haouarianum



Aplidium pantherinum



Aplidium uouo

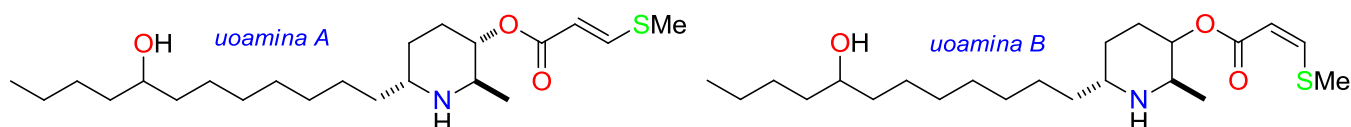


Figura 143. Estructuras de compuestos aislados de diferentes tunicados del género *Aplidium*.

Aplidium tabascum

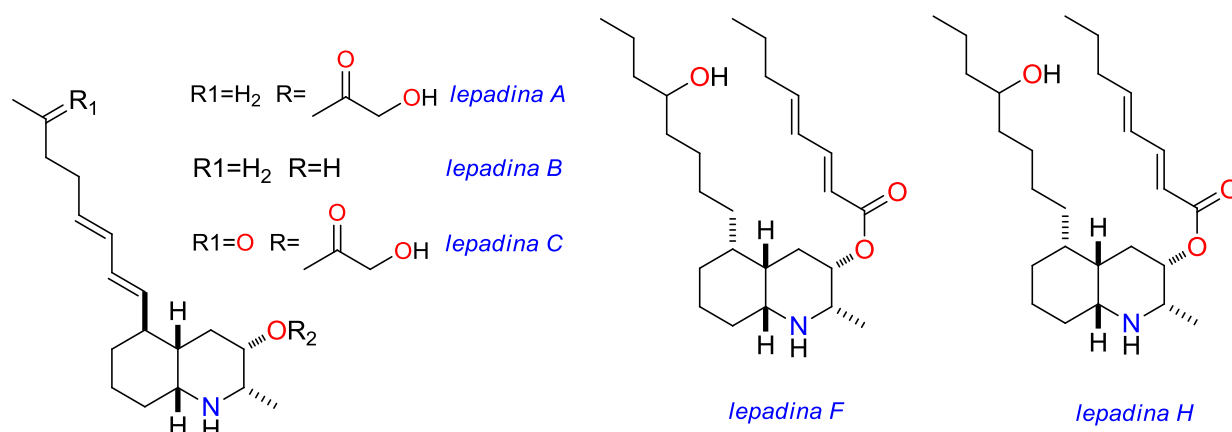


Figura 144. Estructuras de compuestos aislados de diferentes tunicados del género *Aplidium*. Continuación.

III.2.2.2 Estudio químico de *Aplidium falklandicum* y *Aplidium meridianum*

Se ha postulado que en realidad estos dos tunicados son dos morfotipos de la misma especie.⁴¹⁸ Por ello, con el fin de establecer quimiotipos de estas dos ascidias recolectadas en la Antártida, se llevó a cabo el análisis químico de los productos naturales que producen.

III.2.2.2.1 Identificación y clasificación

Los tunicados del género *Aplidium* fueron recolectados por el grupo de investigación coordinado por la Dra. Contxita Avila entre noviembre 2003 y enero 2004 al este del Mar de Weddell en la Antártida a una profundidad de 280 y 340 m. La recolección se llevó a cabo por medio del sistema llamado “Bottom and Agassiz Trawls”, que consiste en una red unida a un marco metálico de forma perpendicular que se arrastra recogiendo los organismos por el fondo marino durante tres minutos. En la Tabla 44 se muestran los organismos recogidos.

Tabla 44. Organismos recolectados con sus códigos.

Nombre	N. de Muestra	Código*
<i>A. falklandicum</i>	1	#180
<i>A. falklandicum</i>	2	#410
<i>A. falklandicum</i>	3	#972
<i>A. meridianum</i>	4	#668
<i>A. falklandicum</i>	5	#515

*Códigos internos de identificación

⁴¹⁸ Varela M. Tesis Doctoral **2007**. Contribución al conocimiento de las ascidias coloniales (Chordata: Tunicata) de la Antártida Occidental y Región Magallánica. Universitat d’Alacant: España.

III.2.2.2 Extracción y fraccionamiento

Los organismos etiquetados como #180 (muestra 1), #410 (muestra 2), #972 (muestra 3) y #515 (muestra 5), fueron extraídos secuencialmente con diclorometano, metanol y agua, siendo el extracto de diclorometano el que se utilizó para proceder a su estudio de cuantificación. Estos procesos de extracción fueron realizados por miembros del Istituto di Chimica Biomolecolare (CNR, Nápoles)

El organismo codificado #668, cuyo peso húmedo era de 331 g, fue extraído y fraccionado siguiendo nuestro esquema habitual ya explicado en otros capítulos de esta tesis. El extracto de diclorometano (**FD**) obtenido se purificó con una columna de Sephadex LH-20 utilizándose una mezcla de metanol:diclorometano (1:1) como fase móvil. De las fracciones obtenidas se aislaron la meridianinas A-G ya descritas en la bibliografía.^{419,420,421}

III.2.2.3 Cuantificación relativa de las meriadininas A-G

Los extractos de diclorometano de los tunicados #180, #410, #972 y #515, junto con la fracción de diclorometano del organismo #668 se utilizaron para la cuantificación de las meridianinas A-G. Los porcentajes relativos en peso entre las meridianinas A-G en el extracto total se obtuvieron mediante un sistema de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de transformada de Fourier LTQ-Orbitrap.

Debido a su naturaleza isomérica, las meridianinas C/D se cuantificaron conjuntamente (ambas presentan iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ a m/z 289.0083). Lo mismo se hizo con las meridianinas isómeras B/E ($[M+H]^+$ a m/z 305.0032).

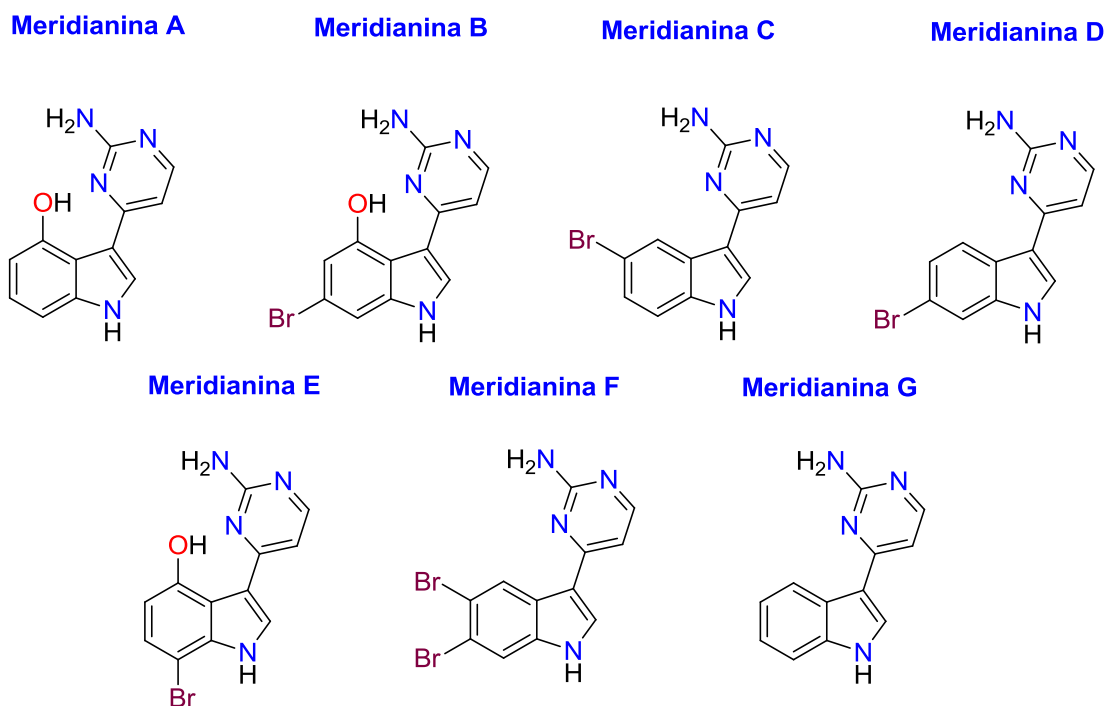


Figura 145. Estructuras de las meriadininas A-G.

⁴¹⁹ Gompel M., Leost M., Bal de Kier Jové E., Puricelli L., Hernández Franco L., Palermo J. A., Meijer L. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2004**, 14, 1703.

⁴²⁰ Hernández Franco L., Bal de Kier Jové E., Puricelli L., Tatián M., Seldes A. M., Palermo J. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1130.

⁴²¹ Seldes A. M., Rodríguez Brasco M. F., Hernández Franco L., Palermo J. A. *Nat. Prod. Res.* **2007**, 21, 555.

Para realizar la cuantificación relativa se utilizó como estándar 50 μg de flumaquina diluida en 1 mL de metanol. En la Tabla 45 se observan los resultados obtenidos para las cinco muestras de *Aplidium meridianum* y de *A. falklandicum* recolectadas:

Tabla 45. Porcentajes de meridianinas relativos a 50 μg de flumaquina en los extractos de diclorometano de las cinco recolecciones de los tunicados de la Antártida.

Meridianinas	Muestra#1 Código#180 <i>A. falklandicum</i>	Muestra#2 Código#410 <i>A. falklandicum</i>	Muestra#3 Código#972 <i>A. falklandicum</i>	Muestra#4 Código#668 <i>A. meridianum</i>	Muestra#5 Código#515 <i>A. falklandicum</i>
A	17.8	5.7	18.7	13.7	19.1
G	3.6	2.2	3.3	1.3	2.8
C/D	34.8	26.8	35.5	21.6	35.4
B/E	40.2	62.6	39.1	61.1	38.5
F	3.6	2.6	3.3	2.3	4.2

Se ha propuesto que *Aplidium meridianum* y *Aplidium falklandicum* podrían ser consideradas como dos morfotipos de la misma especie.⁴¹⁸ Desde el punto de vista quimiotaxonómico, la gran similitud de porcentajes de meridianinas A-G encontrados en *Aplidium meridianum* (muestra#4), en comparación con *Aplidium falklandicum* (muestra#1) parece indicar que en realidad corresponden a la misma especie tal como se había sugerido.

Del análisis cuantitativo (ver Tabla 45) por HPLC-MS de las meridianinas en estas cinco recolecciones se dedujeron las siguientes conclusiones:

1. Las meridianinas B/E constituyen la mezcla isomérica más abundante seguida por la mezcla de meridianinas C/D
2. La meridianina A se encuentran en una proporción intermedia.
3. Las meridianinas F y G son las que aparecen en porcentajes más pequeños y similares en todas las muestras estudiadas.

Por ello a partir de estos porcentajes se puede llegar a distinguir dos quimiotipos distintos:

A.- El primer quimiotipo está formado por las muestras #1, #3, y #5, que presentan unas proporciones de meridianinas muy similares. Es de destacar que los lugares de recolección de esas tres muestras fueron muy cercanos entre si, así como la profundidad a la que fueron recogidas.

B.- El segundo quimiotipo está compuesto por las muestras #2 (*Aplidium falklandicum*) y #4 (*Aplidium meridianum*), con unos porcentajes de meridianinas muy semejantes y que difieren de los encontrados para las muestras #1, #3, y #5.

III.2.2.2.4 Estudio de nuevas meridianinas mediante LC-MS

Con el fin de obtener suficiente extracto para la detección de otras posibles meridianinas, el grupo de investigación de CNR de Nápoles nos envió otros extractos obtenidos de *Aplidium falklandicum* cuyos códigos eran #720 (EB extracto de *n*-butanol), #815 y #829 EE (ambos extractos de dietil éter). Los 3 extractos se juntaron y se sometieron a cromatografía en columna de Sephadex LH-20 utilizándose una mezcla de metanol:diclorometano (1:1) como fase móvil. Se eluyeron una serie de fracciones que, después de ser estudiadas por cromatografía en capa fina (CCF), se agruparon en 8 fracciones que se denominaron MC1-MC8 (ver Figura 146). A continuación, las fracciones MC4-MC8 se sometieron por separado a un análisis de HPLC-MS/MS, empleando una columna C18 y utilizando un gradiente de acetonitrilo-agua con un 0.1% de ácido fórmico. Dicho análisis indicó la presencia de las meridianinas A-G junto con otras de naturaleza desconocida, ya que sus fórmulas moleculares no coincidían con las de las meridianinas publicadas.

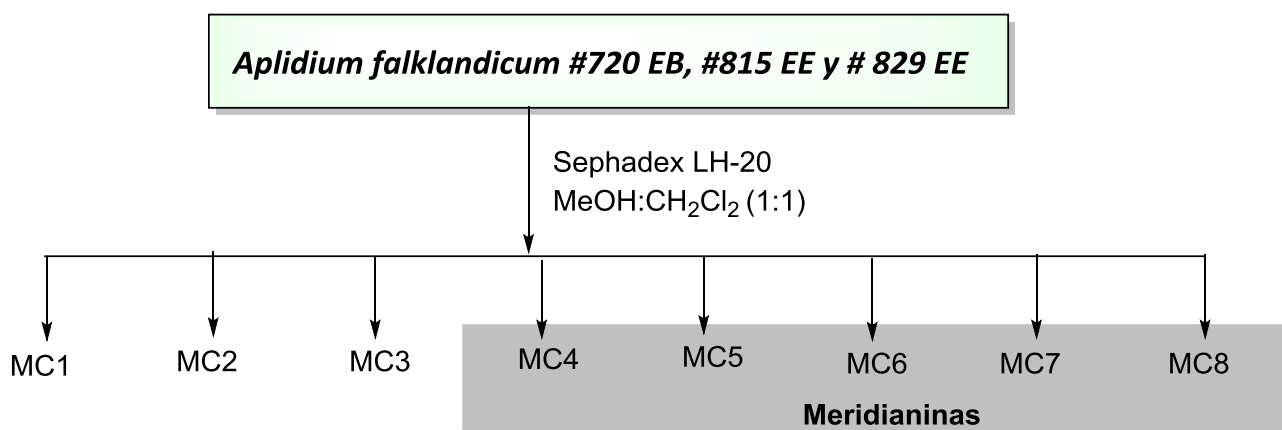
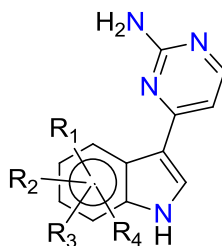


Figura 146. Esquema de purificación de los extractos de *Aplidium falklandicum* y búsqueda de unas nuevas meridianinas.

Dados los precedentes de la presencia de átomos de bromo y grupos hidróxilos en las estructuras de las meridianinas, como es el caso de las meridianinas A-G, se decidió monitorizar los posibles iones pseudomoleculares correspondientes a análogos de las meridianinas con distintas combinaciones de átomos de cloro, bromo y grupos hidroxilo. Estas fórmulas hipotéticas, entradas I-XI en la Tabla 46, son todas las combinaciones posibles con estos tres sustituyentes. Como resultado de dicho estudio, se lograron detectar los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ de todos los compuestos propuestos, a excepción de los correspondientes a las entradas V y IX.

Tabla 46. Estructuras propuestas de los análogos de las meridianinas con las distintas combinaciones de átomos de cloro, bromo y grupos hidroxilos y las correspondientes fórmulas moleculares con las masas exactas relativas a sus iones pseudomoleculares $[M+H]^+$.



Entradas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Fórmula molecular	m/z $[M+H]^+$ *
I	Cl	H	H	H	C ₁₂ H ₈ ClN ₄	245.0594
II	Cl	OH	H	H	C ₁₂ H ₈ ClN ₄ O	261.0543
III	Cl	OH	OH	H	C ₁₂ H ₉ ClN ₄ O ₂	277.0492
IV	Cl	Cl	OH	H	C ₁₂ H ₈ Cl ₂ N ₄ O	295.0153
V	Cl	Cl	OH	OH	C ₁₂ H ₈ Cl ₂ N ₄ O ₂	311.0103
VI	H	Br	OH	OH	C ₁₂ H ₉ BrN ₄ O ₂	320.9987
VII	Cl	Br	H	H	C ₁₂ H ₈ BrClN ₄	322.9699
VIII	Cl	Br	OH	H	C ₁₂ H ₈ BrClN ₄ O	338.9648
IX	Cl	Br	OH	OH	C ₁₂ H ₈ BrClN ₄ O ₂	354.9597
X	H	Br	Br	OH	C ₁₂ H ₉ Br ₂ N ₄ O	382.9143
XI	OH	Br	Br	OH	C ₁₂ H ₈ Br ₂ N ₄ O ₂	398.9092

*Se monitorizaron los iones $[M+H]^+$ de las relaciones m/z indicadas.

III.2.2.2.4.1 HPLC-MS de la fracción MC4

A continuación, se procedió a realizar un monitoreo selectivo de iones correspondientes a los pesos moleculares de las estructuras propuestas en la Tabla 46.

Así, el monitoreo selectivo del ion de relación m/z 398.9092 (entrada **XI**) correspondiente al compuesto de fórmula molecular C₁₂H₈Br₂N₄O₂, permitió obtener un cromatograma (Figura 147B) en el que se observa un pico cromatográfico con un t_R a 12.34 min. Su espectro de masas (Figura 147F) mostró un grupo isotópico con relaciones de intensidades de los picos m/z 400.9059/402.9038/398.9081 aproximadamente 1:2:1, que confirmó la presencia de dos átomos de bromo en su estructura. A este compuesto se denominó meridianina S (Figura 147B).

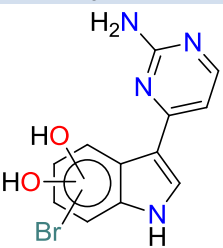
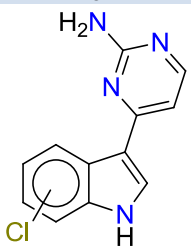
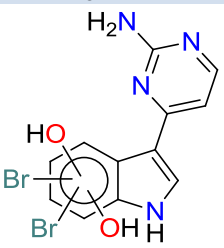
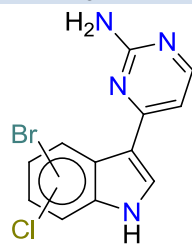
En la monitorización del ion de relación m/z 245.0594 (entrada **I**) correspondiente a la fórmula molecular C₁₂H₈ClN₄ se detectaron dos picos cromatográficos (Figura 147A) con t_R a 10.15 y 13.51 min cuyos espectros de masas (Figura 147D y Figura 147E) mostraron iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ con la misma relación m/z 245.0585, indicando que se tratan de dos compuestos isómeros. La relación de intensidades 2:1 del grupo isotópico de los pseudomoleculares $[M+H]^+$ a m/z 245 y 247, corroboró la presencia de un átomo de cloro en estos compuestos. Estos dos compuestos se denominaron meridianinas I e I' y se corresponden a las estructuras propuestas en la entrada **I** de la Tabla 46.

Repitiendo el mismo procedimiento, se realizó un monitoreo selectivo del ion de relación m/z 322.9699 (entrada **VII**) correspondiente a un compuesto de fórmula molecular C₁₂H₈BrClN₄, obteniéndose un

cromatograma (Figura 147C) en el que se observa un pico cromatográfico con un t_R a 15.05 min. Su espectro de masas (Figura 147G) mostró un grupo isotópico con relaciones m/z 322/324/326 del ión pseudomolecular $[M+H]^+$ con intensidades aproximadas de 8:10:2 que confirmó la presencia de un átomo de bromo y otro de cloro en su estructura. Este compuesto se denominó meridianina K.

Adicionalmente, el monitoreo selectivo del ion de relación m/z 320.9987 (entrada VI) correspondiente a compuestos de fórmula molecular $C_{12}H_9BrN_4O_2$, permitió obtener un cromatograma (Figura 148A) en el que se observan dos picos cromatográficos con t_R a 11.20 y 12.58. Sus espectros de masas correspondientes (Figura 148B y Figura 148C) mostraron las mismas relaciones a m/z 320.9976 y m/z 322.9957, indicando que poseía un átomo de bromo y que deben de tratarse de dos compuestos isoméricos que se nombraron como meridianinas P y meridianinas P' (Tabla 47).

Tabla 47. Estructuras propuestas de los análogos de las meridianinas detectadas en la fracción MC4.

t_R (min)	11.20	10.15, 13.51	12.34	15.05
Iones monitorizados	320.9976/ 322.9957	245.0585/247.0655	400.9059/402.9038/398.9080	324.9665/322.9698
Masa exacta (calc.)	320.9987	245.0594	398.9092	322.9699
Fórmula molecular	$C_{12}H_9BrN_4O_2$	$C_{12}H_8ClN_4$	$C_{12}H_8Br_2N_4O_2$	$C_{12}H_8BrClN_4$
Estructura propuesta	 Meridianina P Meridianina P'	 Meridianina I Meridianina I'	 Meridianina S	 Meridianina K
Entrada (ver Tabla 46)	VI	I	XI	VII

RT: 0,00 - 29,99

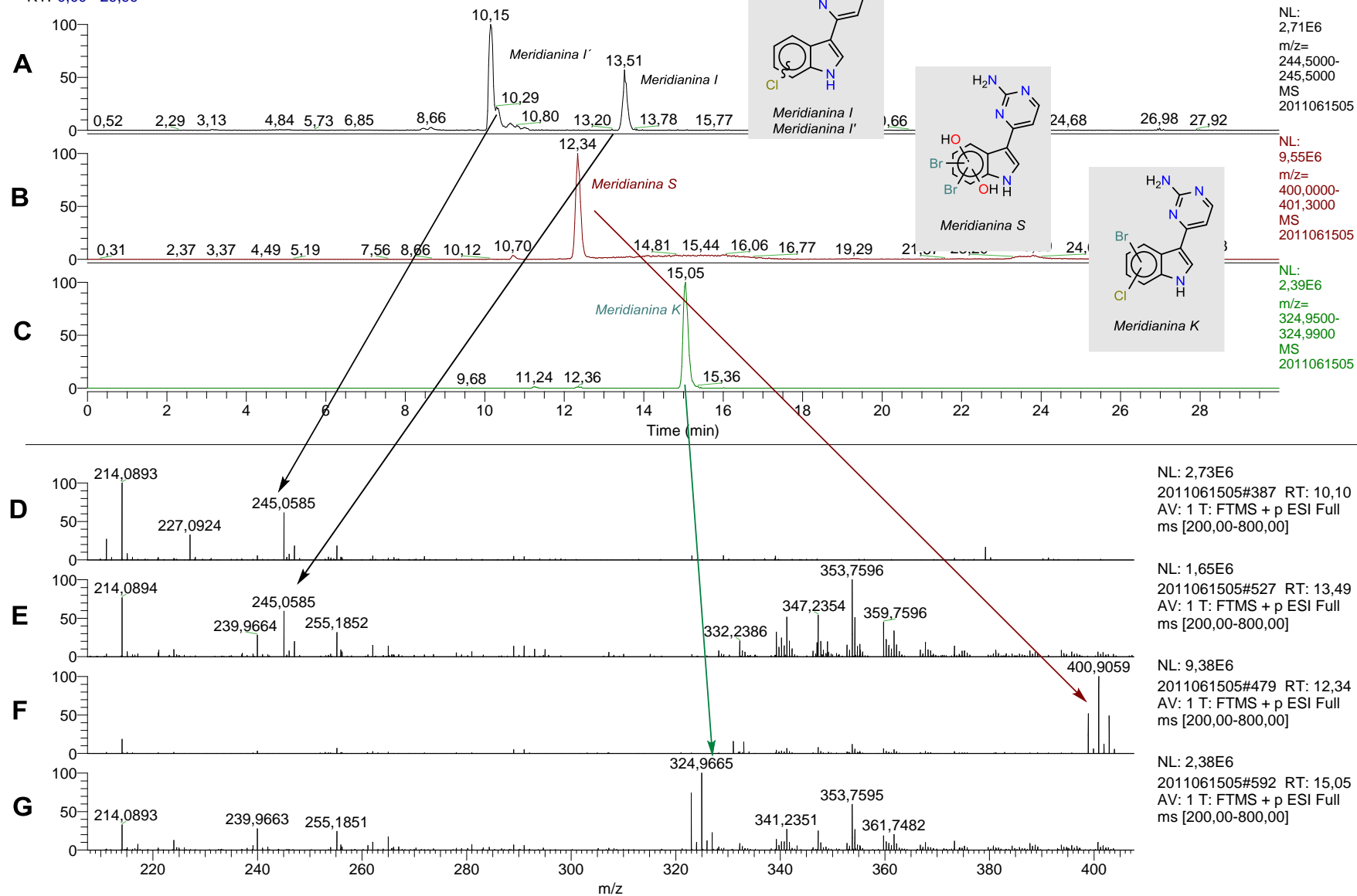


Figura 147. (A) Monitorización selectiva del ion de relación m/z 245.0594 (masa teórica). (B) Monitorización selectiva del ion de relación m/z 398.9092 (masas teórica). (C) Monitorización selectiva del ión de relacion m/z 324.9670 (masa teórica). (D-G) Espectros de masas de alta resolución de los picos cromatograficos de los cromatogramas A-C.

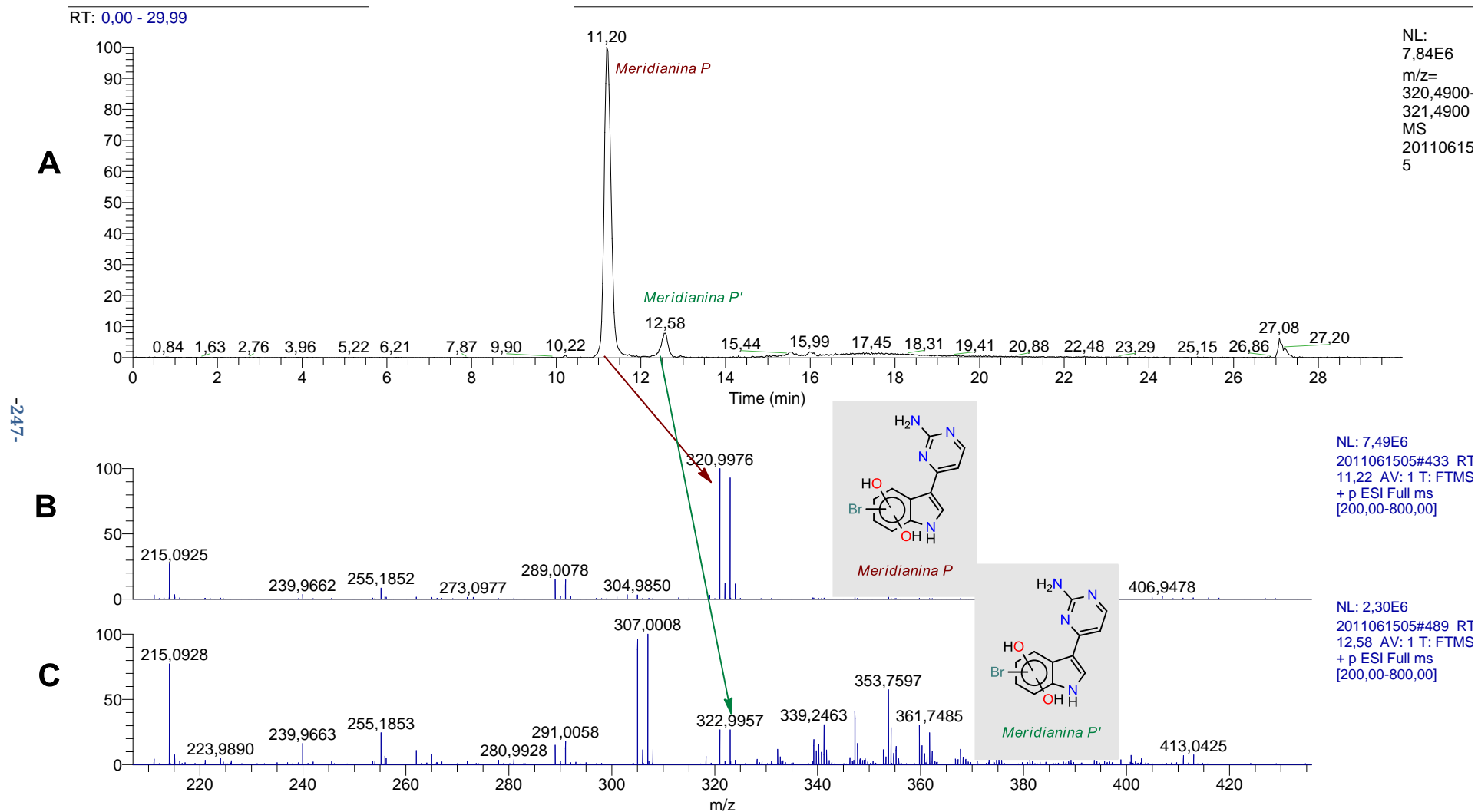


Figura 148. (A) Monitorización selectiva del ion de relación m/z 320.9987 masa teórica (B y C) Espectros de masas de alta resolución de los picos cromatográficos del cromatograma A.

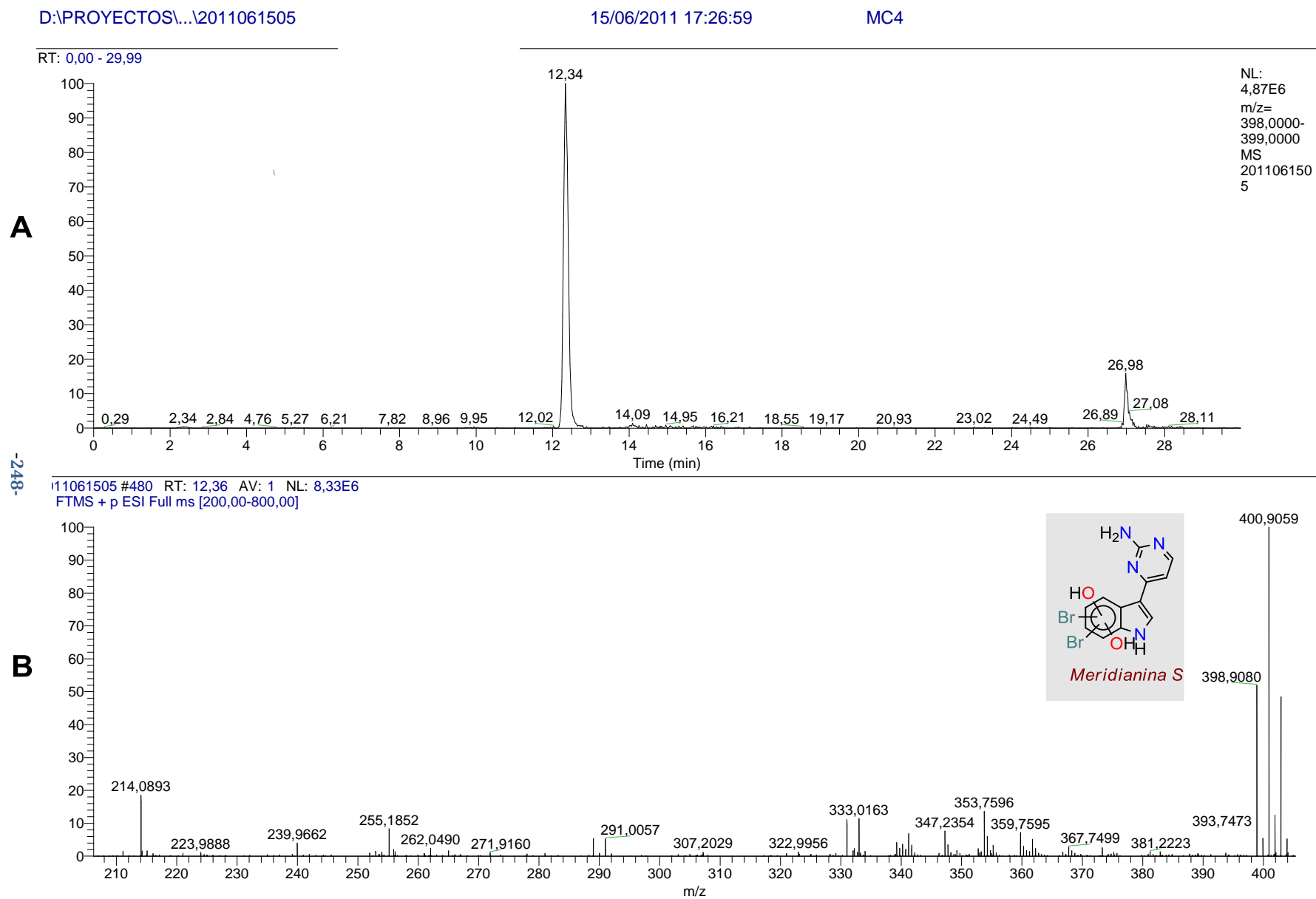


Figura 149. Ampliación de la Figura 147B: (A) monitorización selectiva del ion de relación m/z 398.9092 (B). Espectro de masas de alta resolución del pico cromatográfico de t_R 12.34.

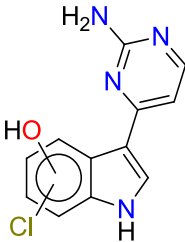
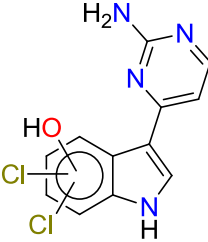
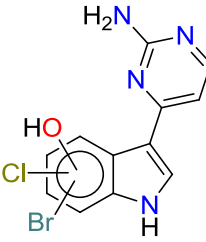
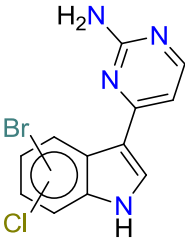
III.2.2.2.4.2 HPLC-MS de la fracción MC5

El monitoreo selectivo del ion de relación m/z 261.0543 (entrada **II**) correspondiente al compuesto de fórmula molecular $C_{12}H_8ClN_4O$, permitió obtener un cromatograma (Figura 150A) en el que se observa dos picos cromatográficos con t_R a 11.94 y a 12.30 min. Sus espectros de masas correspondientes (Figura 150E y Figura 150F) mostraron los grupos isotópicos con la misma relación m/z 261.0543 y 263.0503, indicando que se tratan de dos compuestos isoméricos de fórmula molecular $C_{12}H_8ClN_4O$. La relación de intensidades 2:1 de dicho grupo isotópico corroboró la presencia de un átomo de cloro en estos compuestos. Estos dos compuestos se denominaron meridianinas J e J' y se corresponden a las estructuras propuestas en la entrada **II** de la Tabla 46.

Monitoreos selectivos adicionales de los iones de relación m/z 295.0153, 338.9648 y 322.9699, correspondientes a las fórmulas moleculares $C_{12}H_8Cl_2N_4O$, $C_{12}H_8BrClN_4O$, y $C_{12}H_8BrClN_4$ realizando un procedimiento similar al anterior, rindieron los cromatogramas de las Figura 150B-D. De sus espectros de masas correspondientes (Figura 150E-I) se deducen los compuestos de estructuras en las entradas **IV**, **VIII** y **VII** que fueron nombradas como meridianinas L, Q, y K respectivamente.

Un compuesto con el mismo peso molecular que la meridianina K ya había sido detectado en la fracción MC4.

Tabla 48. Estructuras propuestas de los análogos de las meridianinas detectadas en la fracción MC5.

t_R (min)	11.94, 12.30	14.05	14.34	15.08
Iones monitorizados	261.0534 / 261.0503	295.0143	$[M+H]^+$ 340.9615	$[M+H]^+$ 324.9667
Masa exacta (calc.)	261.0543	295.0153	338.9648	322.9699
Fórmula molecular	$C_{12}H_8ClN_4O$	$C_{12}H_8Cl_2N_4O$	$C_{12}H_8BrClN_4O$	$C_{12}H_8BrClN_4$
Estructura	 <p>Meridianina J Meridianina J'</p>	 <p>Meridianina L</p>	 <p>Meridianina Q</p>	 <p>Meridianina K</p>
Entrada	II	IV	VIII	VII

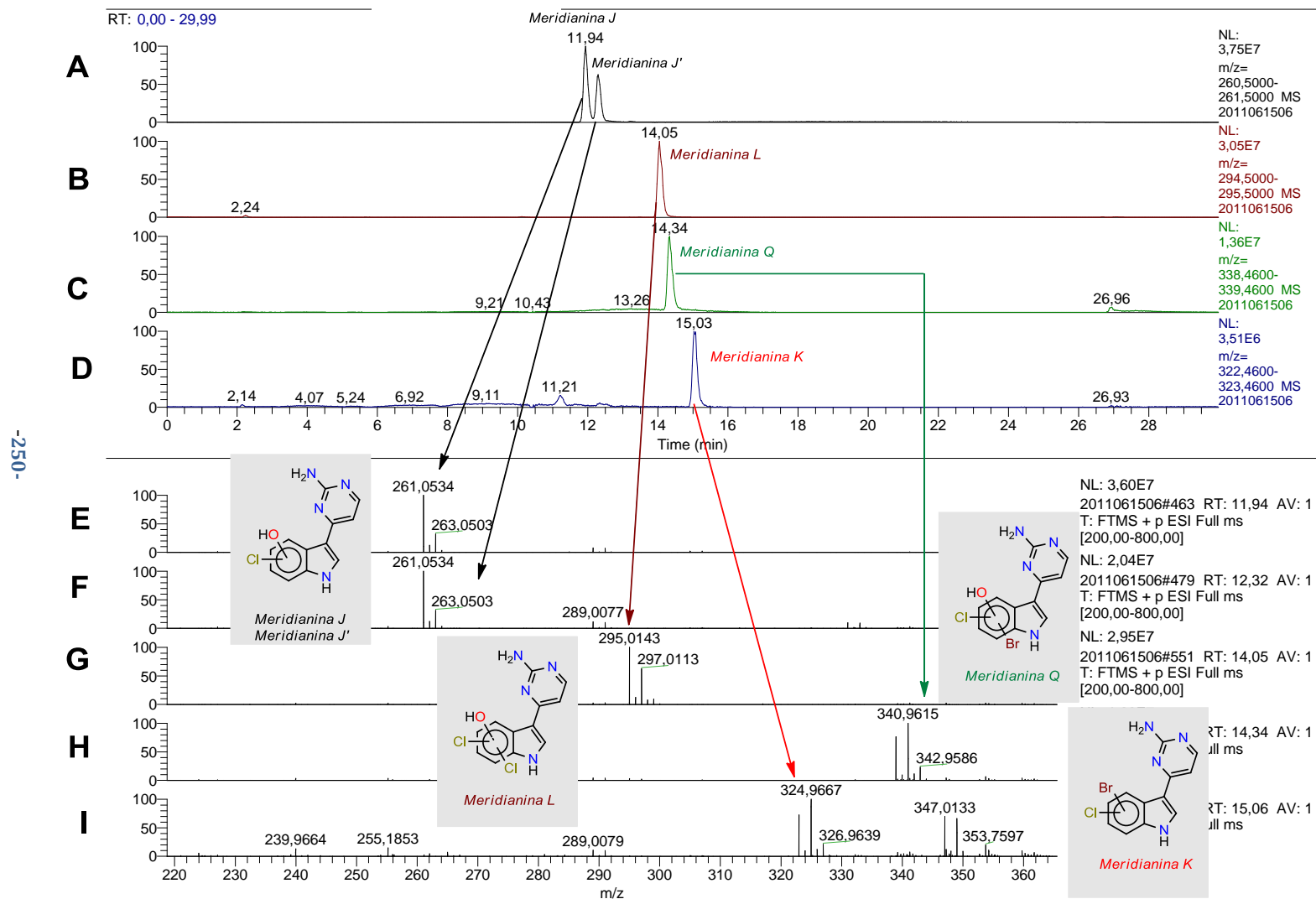


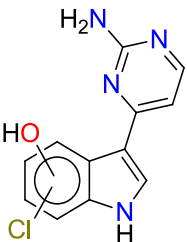
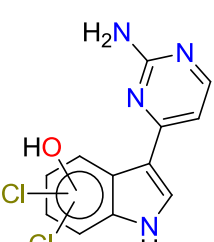
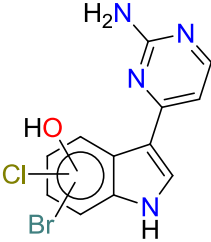
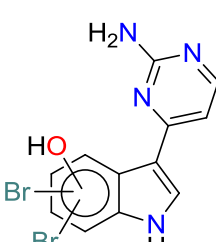
Figura 150. (A-D) Monitorización selectiva de los iones de relaciones m/z 261.0543, 295.0153, 338.9648 y 322.9699. (E-I) Espectros de masas de alta resolución de los picos cromatograficos de los cromatogramas A-D.

III.2.2.2.4.3 HPLC-MS de la fracción MC6

Repitiendo el mismo proceso que en las fracciones anteriores, en la fracción MC6 se detectaron hasta seis meridianinas Figura 151, que se denominaron meridianina J y J' [Figura 151 (A y E), (A y F)], meridianina L (Figura 151 (B y G)), las meridianinas Q [Figura 151 (C y H)] y la isomérica Q' (Figura 151 (C e I)) que también habíamos encontrado en MC5 y otra nueva meridianina R [Figura 151 (D y J)].

En la Tabla 49 se describe los tiempos de retención, los iones pseudomoleculares así como las fórmulas moleculares correspondientes.

Tabla 49. Estructuras propuestas de los análogos de las meridianinas detectadas en la fracción MC6.

$t_R(\text{min})$	11.93, 12.31	14.04	14.35	13.89
Iones monitorizados	261.0533 261.0534	295.0134	$[M+2H]^+$ 340.9613 340.9615	$[M+H]^+$ 384.9112
Masa exacta (calc.)	261.0543	295.0153	338.9648	382.9143
Fórmula molecular	$C_{12}H_8ClN_4O$	$C_{12}H_8Cl_2N_4O$	$C_{12}H_8BrClN_4O$	$C_{12}H_9Br_2N_4O$
Estructura	 <p>Meridianina J Meridianina J'</p>	 <p>Meridianina L</p>	 <p>Meridianina Q Meridianina Q'</p>	 <p>Meridianina R</p>
Entrada	II	IV	VIII	X

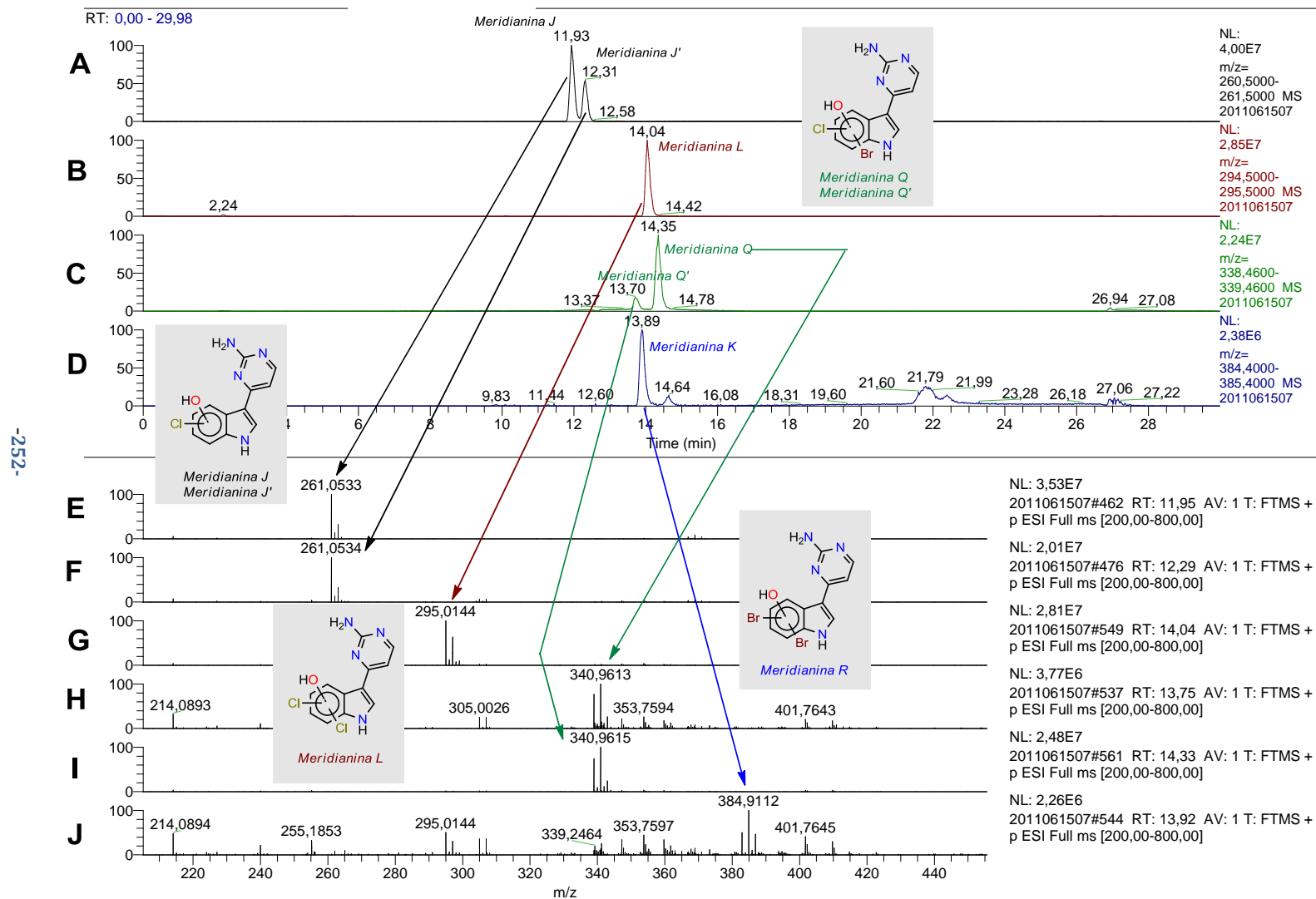


Figura 151. (A-D) Monitorización selectiva de los iones de relaciones m/z 261.0543, 295.0135, 338.9648, 382.9143. (E-I) Espectros de masas de alta resolución de los picos cromatograficos de los cromatogramas A-D correspondientes de la fracción MC6.

III.2.2.2.4.4 HPLC-MS de la fracción MC7

De igual forma que en las fracciones anteriores se repitió el estudio con la fracción MC7 (Figura 152) detectandose dos nuevos análogos que fueron meridianinas R y R' (Tabla 50).

Tabla 50. Estructura propuesta de los análogos de las meridianinas detectadas en la fracción MC7.

t_R(min)	13.87, 14.64
Ión	[M+H] ⁺
pseudomolecular	384.9112
Masa exacta	382.9143
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₉ Br ₂ N ₄ O
Estructura	<p>Meridianina R Meridianina R'</p>
Entrada	X

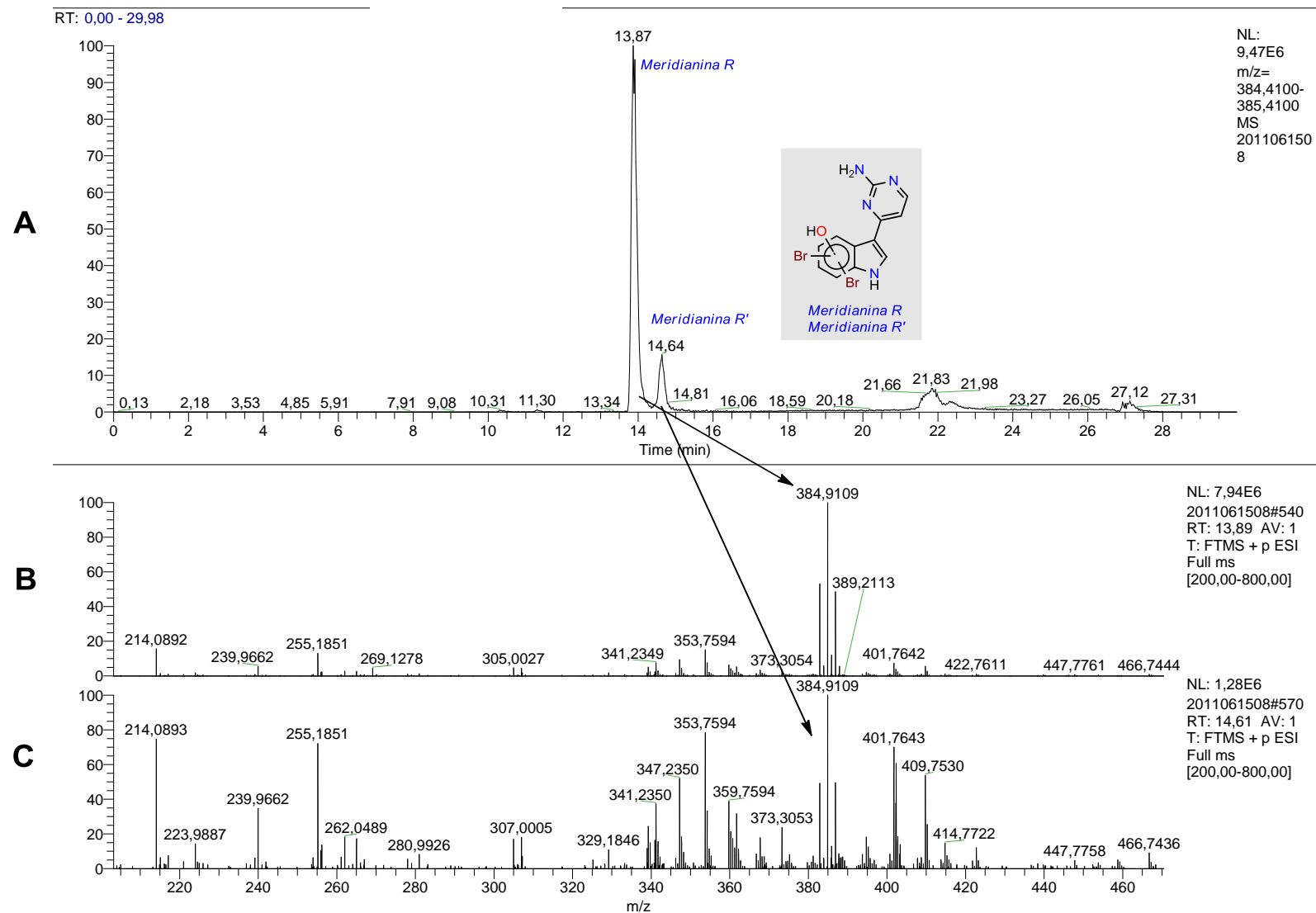


Figura 152. (A) Monitorización selectiva del ion de relación m/z 384.9143. (B-C) Espectros de masas de alta resolución de los picos cromatograficos del croamatograma correspondiente a la fracción MC7

III.2.2.2.4.5 HPLC-MS de la fracción MC8. Dímeros de meridianinas

En los espectros de masas que emplean el método de ionización electrospray (ESI) es fácil detectar la presencia de iones pseudomoleculares $[2M+H]^+$ correspondientes a aductos de dímeros, que en algunos casos aparecen multicargados con dos o más cargas positivas. Sin embargo, en los espectros de masas de las fracciones-mezcla que contienen las meridianinas se observan iones pseudomoleculares $[2M-H]^+$, acompañados de los correspondientes iones pseudomoleculares dicargados $[2M+2H]^{+2}$, lo que sugiere que las dos unidades monoméricas deben de estar unidas por un enlace covalente. Esto nos llevó a postular la presencia de posibles dímeros de las meridianinas conocidas, por lo que se decidió buscarlos en un segundo estudio.

Con el fin de buscar dímeros de las meridianinas mayoritarias (A, B, E ó F) se realizó un monitoreo selectivo de los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ con relaciones m/z elevadas de la fracción MC8, obteniéndose el cromatograma de la Figura 153.

Así de la monitorización de los iones de relación m/z 607.9743 y 303.9960, correspondientes a las fórmulas moleculares, $C_{24}H_{16}Br_2N_8O_2$ y $C_{12}H_9BrN_4O$, se obtuvieron el cromatograma de la Figura 153A en el que se observa un pico cromatográfico con t_R a 13.01 min. El espectro de masas correspondiente (Figura 153B) mostró iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ y $[M+2H]^{+2}$ a m/z 304.9939 y 608.9808 para los que se proponen los compuestos de las estructuras diméricas meridianinas B ó E (Tabla 51).

Adicionalmente, se monitorizaron otros iones de relación m/z 450.1618, 226.0855 correspondientes a las fórmulas moleculares relacionadas $C_{24}H_{18}N_8O_2$ y $C_{12}H_{10}N_4O$, obteniéndose el cromatograma de la Figura 154A en el que destaca el pico cromatográfico con t_R a 10.84 min. Su espectro de masas (Figura 154B) mostró iones pseudomoleculares $[M-M+2H]^{+2}$ y $[M-M-2H+H]^+$ a m/z 226.0845 y 451.1618 para los que se proponen los compuestos de las estructuras diméricas de la meridianina A (Tabla 52).

Tabla 51. Estructuras propuestas de los dímeros de meridianinas detectados en la fracción MC8.

t_R (min)	13.01	13.01	10.84	10.84
Ión pseudomolecular	$[M+M-2H+H]^+$ 608.9808	$[M:M+2H]^{+2}$ 304.9939	$[M-M-2H+H]^+$ 451.1618	$[M:M+2H]^{+2}$ 226.0845
Masa exacta	607.9743	303.9960	450.1553	226.0855
Fórmula molecular	$C_{24}H_{16}Br_2N_8O_2$	$C_{12}H_9BrN_4O$	$C_{24}H_{18}N_8O_2$	$C_{12}H_{10}N_4O$
Estructura				

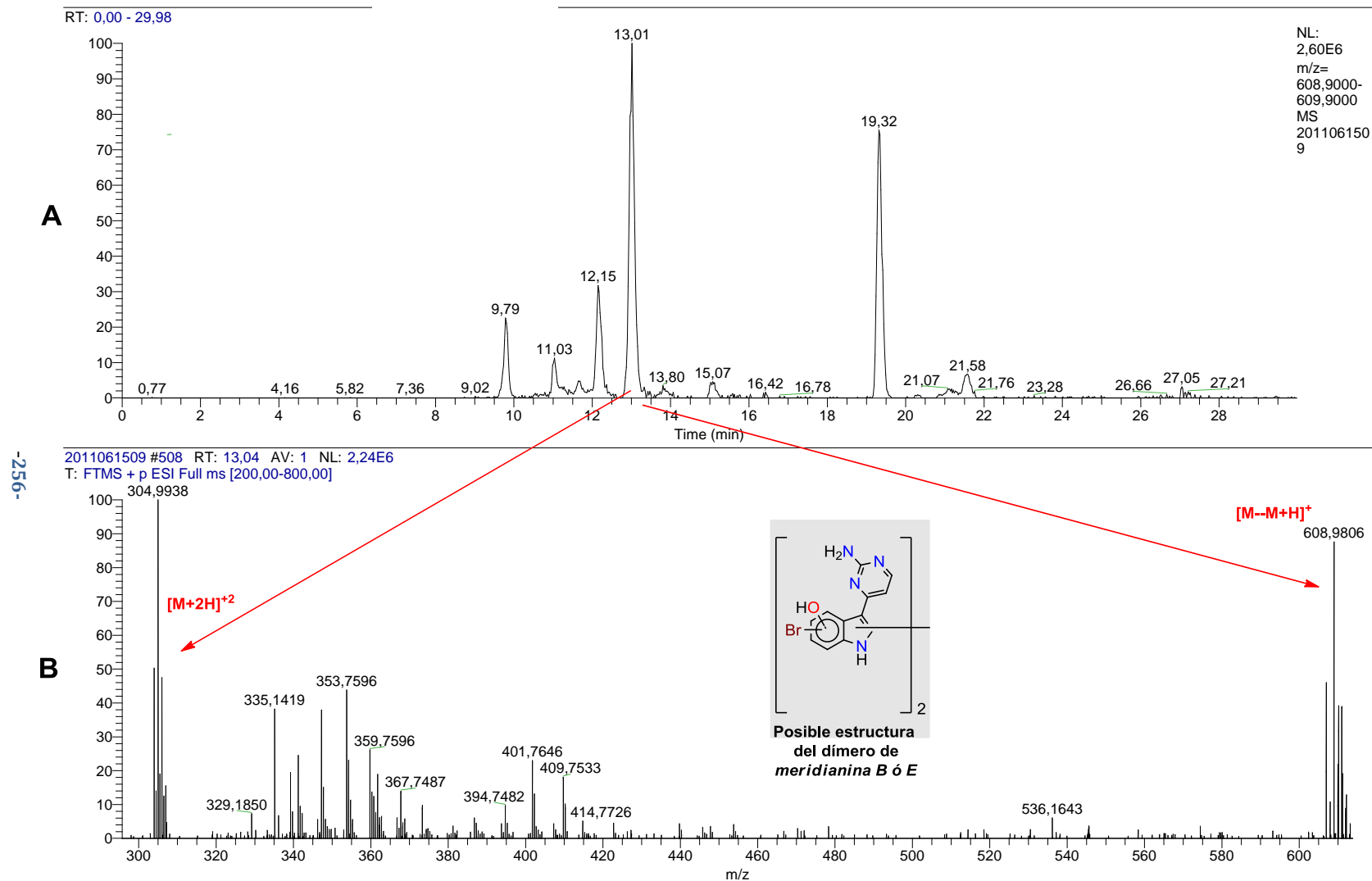


Figura 153. (A) Monitorización selectiva del ion de las relaciones m/z 607.9743, 303.9960. **(B)** Espectro de masas de alta resolución de los picos cromatograficos del cromatograma A correspondientes a la fracción MC8.

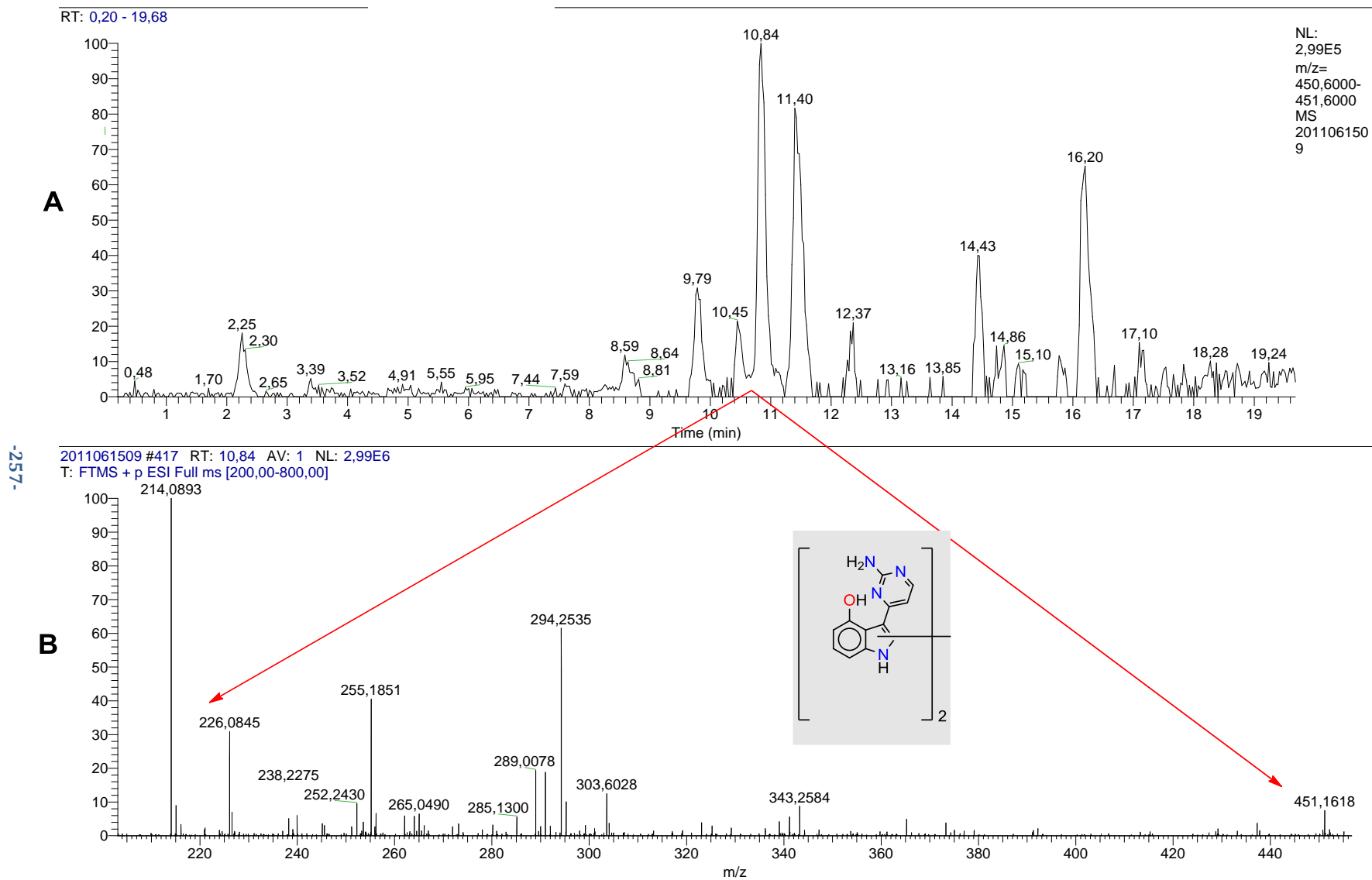


Figura 154. (A) Monitorización selectiva del ion de las relaciones m/z 450.1553, 226.0855. **(B)** Espectro de masas de alta resolución de los picos cromatograficos del cromatograma A correspondientes a la fracción MC8.

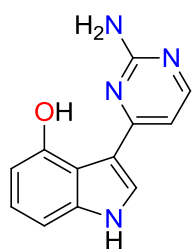
III.2.2.2.5 Compuestos aislados de *Aplidium meridianum*

En la Figura 155 se muestran las estructuras propuestas de las meridianinas detectadas, con sus posibles estructuras tentativas, ya que a partir de la espectrometría de masas no se puede deducir las posiciones de los sustituyentes.

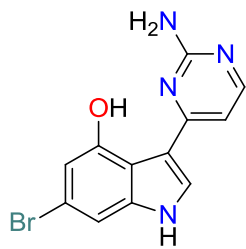
	<i>Meridianina I</i> <i>Meridianina I'</i>	<i>Meridianina J</i> <i>Meridianina J'</i>	<i>Meridianina K</i>	<i>Meridianina L</i>
Fórmula	$C_{12}H_8ClN_4$	$C_{12}H_8ClN_4O$	$C_{12}H_8BrClN_4$	$C_{12}H_8Cl_2N_4O$
Pico $[M+H]^+$	245.0594	261.0543	322.9699	295.0153
	<i>Meridianina O</i>	<i>Meridianina P</i> <i>Meridianina P'</i>	<i>Meridianina Q</i> <i>Meridianina Q'</i>	
Fórmula	$C_{12}H_9ClN_4O_2$	$C_{12}H_9BrN_4O_2$	$C_{12}H_8BrClN_4O$	
Pico $[M+H]^+$	277.0492	320.9987	338.9648	
	<i>Meridianina R</i> <i>Meridianina R'</i>	<i>Meridianina S</i>	<i>Meridianina B ó E</i>	<i>Meridianina A</i>
Fórmula	$C_{12}H_9Br_2N_4O$	$C_{12}H_8Br_2N_4O_2$	$C_{24}H_{16}Br_2N_8O_2$	$C_{24}H_{18}N_8O_2$
Pico $[M+H]^+$	382.9143	398.9092	607.9743	450.1553

Figura 155. Estructuras propuestas de los nuevos análogos de las meridianinas detectadas en varias especies de *Aplidium*.

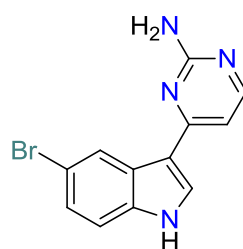
Además se aislaron del espécimen *Aplidium meridianum* código #668 los siguientes compuestos ya descritos en la bibliografía:^{420,421,419}



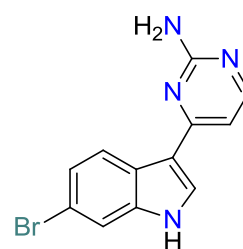
meridianina A



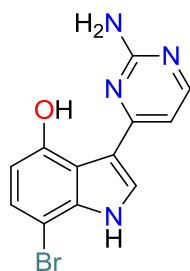
meridianina B



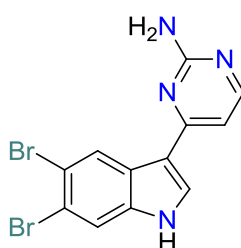
meridianina C



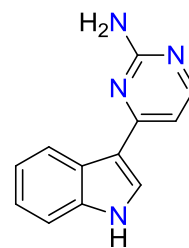
meridianina D



meridianina E



meridianina F



meridianina G

III.3 Conclusiones del capítulo III

A. Del estudio químico de la esponja *Jaspis* cf. *coricea*, recolectada en Boi-Boi, en isla de Waga (Papua Nueva Guinea) se dedujeron las siguientes conclusiones:

1. A partir de la fracción de diclorometano **FD** se aislaron tres fracciones-mezcla de esteres de bengazoles utilizando diferentes técnicas cromatográficas.
2. La hidrólisis básica de cada una de fracciones-mezcla rindió el mismo producto, el cual no había sido descrito hasta al momento y que se nombró como bengazol Z (**33**).
3. Utilizando técnicas espectroscópicas de RMN y espectrometría de masas se lograron identificar, además de los compuestos conocidos bengazol A (**31**) y bengazol B (**32**), 7 nuevos bengazoles a partir de fracciones mezcla que se llegaron a separar totalmente.
4. Los compuestos determinados por nuestro estudio de masas y espectroscopia de RMN fueron en la fracción-mezcla 1: bengazol C₂ (**24**), bengazol C₆ (**30**), en la fracción-mezcla 2, bengazol C₂ (**24**), bengazol C₃ (**26**), bengazol C₄ (**28**) y en la fracción-mezcla 3, bengazol D₂ (**25**), bengazol D₃ (**27**), bengazol D₄ (**29**), bengazol C₆ (**30**), todos ellos nuevos compuestos naturales. Además se aislaron como compuestos puros bengazol A (**31**) y bengazol B (**32**) que ya habían sido descritos en la bibliografía.
5. Los bengazoles A (**31**) y B (**32**) y Z (**33**) fueron evaluados en el panel de las 60 líneas celulares del NCI. Bengazol A (**30**) mostró una actividad muy potente frente a células tumorales de colon COLO-205, [GI₅₀=0.181 μ M (0.085 μ g/ml, TGI=1.5 μ M, LC₅₀=5.25 μ M)], y melanoma SKMEL-5, [GI₅₀=1.13 μ M, TGI=4.83 μ M, LC50=4.83 pM (4)]. El compuesto de hidrólisis, bengazol Z (**33**), y el bengazol B (**31**) fueron inactivos frente a dichas líneas celulares.

B. Del estudio químico de los tunicados *Aplidium falklandicum* y *Aplidium meridianum* que fueron recolectados entre noviembre 2003 y enero 2004 en el este del Mar de Weddell en la Antártida se concluyó:

1. De los extratos de diclorometano y utilizando diferentes técnicas cromatográficas se aislaron las meridianinas A-G.
2. Se cuantificaron la presencia de estas meridianinas en dos posibles morfoespecies de *Aplidium* utilizando LC-MS con detección en alta resolución mediante detector de masas FT-Orbitrap.
3. Para determinar estructuras análogas a las meridianinas no descritas anteriormente en la bibliografía, se utilizó la técnica LC-MS con detección FTMS-Orbitrap. Se realizó una monitorización selectiva de iones de masas de nuevas posibles meridianinas con combinaciones de átomos de cloro, bromo y grupos hidroxilo. Se detectaron y se propusieron las estructuras tentativas de la meridianina I, meridianina I', meridianina J, meridianina J', meridianina K meridianina L, meridianina O, meridianina P, meridianina P', meridianina Q, meridianina Q', meridianina R, meridianina R', meridianina S, un dímero de las meridianinas B ó E y el dímero de la meridianina A.



IV.1. Procedimientos generales

ESPECTROS DE RMN

Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron en los equipos Bruker AC 200 F, Avance 300 y Avance 500 de la Universidad de A Coruña y Bruker AC-250 y en los equipos Varian Unity Plus 500 de la Universidad de California Santa Cruz (EEUU). Se utilizaron como disolventes deuterados cloroformo (CDCl_3 , 99.8%), metanol (MeOD , 99.98%) y benceno (C_6D_6 , 99.8%). Los desplazamientos químicos están referidos en la escala δ (ppm). Para los espectros de RMN de ^1H se utilizó como referencia interna la señal del disolvente residual no deuterado a δ_{H} 7.26 ppm para el cloroformo, δ_{H} 3.31 para el metanol y δ_{H} 7.16 para el benceno. Para los espectros de ^{13}C se utilizó como referencia interna el pico central de la señal de disolvente deuterado a δ_{C} 77.0 para el cloroformo, δ_{C} 49.2 para metanol y δ_{C} 128.4 para el benceno.

ESPECTROS DE MASAS

Los espectros de masas de ionización electrónica y FAB se obtuvieron en los espectrómetros VG-70-VSE, VGQuattro y FIONS VG AUTOSPEC M de la Universidad de Santa Cruz, CA. En el caso de los espectros FAB positivo se utilizó una matriz de tioglicerol. Algunos de los espectros de FAB se realizaron con una matriz Magic Bullet que consiste en una mezcla de ditiotreito:litioeritritol (3:1). Los espectros de APCI y ESI en modo positivo se realizaron con una fase móvil de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1) utilizando un espectrómetro Navigator de Thermo. Los espectros de ESI de alta resolución se realizaron en un equipo Qstar Qq-TOF de Applied Biosystems Universidade da Coruña.

ESPECTROS DE IR

Se registraron en un aparato Matson FTIR y los valores están dados en cm^{-1} . Las muestras se disolvieron en CHCl_3 y/o se prepararon en película sobre discos de NaCl.

ACTIVIDADES ÓPTICAS

Se midieron en un polarímetro JASCO DIP-1000 con una lámpara de sodio (λ 590 nm). Las concentraciones se expresan en g/100mL y el disolvente usado se indica en cada caso.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice 60 F_{254} de Merk. Las cromatografías se siguieron por UV(254) para los compuestos que absorben a dicha longitud de onda y/o por revelado con yodo o con una disolución de molibdato amónico en ácido sulfúrico al 10%.

Cromatografía en columna

Se usó como adsorbente gel de sílica (230-400 mesh) de Merk.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Se usaron los cromatógrafos Waters modelo 501 y 510 equipados con un detector de índice de refracción modelo 41: cromatógrafo Waters modelo 501 equipado con un detector de índice de refracción conectado a una interfase para analizar los cromatogramas con el software EZChrome; cromatógrafo Hewlet Packard serie 1100 con un detector de índice de refracción modelo HP 1047A. Las columnas semipreparativas de fase invertida usadas fueron: μ -Bondapack C18, Sharlau Nucleosil C18, 10 μ m ODS, C18 de sílica Regis C18 (250 x 4.6 mm tamaño de poro 300 Å y 5 μ m de tamaño de partícula) y la columna analítica Regis SemiPermeable Surface (SPS)-C8 (250x4.6 mm 100 Å y 5 μ m de tamaño de partícula). Para fase normal se utilizó una columna μ porasil.

IV.2 Parte experimental Capítulo I

IV.2.1 Parte experimental del coral blando *Briareum* sp.

Recolección de la muestra

El coral blando *Briareum* sp. fue recolectado en las islas Togian, Sulawesi (Indonesia) buceando a una profundidad de 10-15 metros, en una expedición científica realizada en la primera quincena de Octubre del año 1995.

La identificación taxonómica de este coral blando como *Briareum* sp. fue realizada por el Dr. Ramil Blanco del Departamento de Recursos Naturales e Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Vigo. En la actualidad, los géneros *Briareum* y *Solenopodium* han sido unificados bajo el de *Briareum*. Una muestra bajo el código JR 9524 y una foto están guardadas en el Departamento de Química Fundamental de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Extracción y fraccionamiento

El organismo troceado se extrajo tres veces con MeOH, obteniéndose 0.2 kg peso en seco después de eliminar el disolvente. El extracto orgánico se distribuyó en dos partes iguales de agua (fracción W) y diclorometano (fracción F). La fracción F se evaporó a sequedad, se disolvió en MeOH:H₂O (9:1) y se extrajo con hexano para obtener la fracción FH. La fase metanólica-acuosa se llevó al 50% de MeO:H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ originando dos nuevas fracciones: la fracción de CH₂Cl₂ (FD) y la metanólica-acuosa (FM). La fracción W se extrajo con n-butanol saturado con agua para dar la fracción butanólica (WB). Los pesos obtenidos en cada una de las fracciones son los siguientes:

Fracción	FH	FD	FM	WB
Cantidad (g)	4.48 g	7.41 g	0.69 g	1.8 g

Cromatografía de la fracción FD

La cromatografía de los 7.4 g de FD (Esquema 1) se llevó a cabo en una columna de gel de sílice (230-400 mesh) comenzando con CH₂Cl₂ y aumentando la polaridad con 0.5% de MeOH. Las fracciones obtenidas se estudiaron por CCF utilizándose como reveladores luz UV a $\lambda = 254$ nm y una disolución de molibdato amónico en ácido sulfúrico al 10% y se reunieron en las fracciones C1-C11, cuyos pesos se muestran a continuación:

Fracción	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
Cantidad (mg)	10	7	32	506	268	265	590	143	923	148	47

Los espectros de las fracciones C4, C6, C8 y C9 mostraron señales espectroscópicas interesantes por lo que se procedió a su estudio.

Cromatografía líquida de alta eficacia de la fracción FDC4

La separación de la fracción **FDC4** por NP-HPLC utilizando una columna μ -Porasil, Hexano/ACOEt (45:55) como fase móvil y un flujo de 1.0 mL/min rindió las siguientes fracciones:

Fracción FDC4	H1	H2	H2'	H3	H3'	H4	H4'	H5	H6	H6'	H7	H7'	H8	H8'
Cantidad mg	17	12	13	33	23	75	31	5	12	27	24	28	18	13
t _R min	17	18	20	19	22	22	25	25	30	32	35	43	47	51

La separación de la fracción **FDC4H2'** por RP-HPLC utilizando una columna μ -Bondapack C18, MeOH/H₂O (60:40) como fase móvil y un flujo de 1.0 mL/min rindió las siguientes 5 fracciones:

Fracción FDC4H2'	H2	H3	H4	H5
Cantidad mg	2	1	3	2
t _R min	31	33	34	37

Las fracciones **FDC4H3** y **FDC4H7'** se purificaron por RP-HPLC utilizando la columna μ -Bondapack C18, MeOH/H₂O (60:40) como fase móvil y un flujo de 1 mL/min para dar origen a las siguientes fracciones:

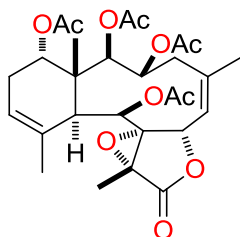
Fracción FDC4H3	H2	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
Cantidad (mg)	2	1	3	3	3	5	4	5	3	3
t _R min	17	24	26	29	32	34	36	38	45	49
Compuesto N°	6						10			1

Fracción FDC4H7'	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Cantidad (mg)	4	7	5	1	3	3	3	5	2
t _R min	21	24	27	29	30	34	39	46	58
Compuesto N°								9	8

Cromatografía de alta eficacia de la fracción FDC6

La fracción **FDC6** se purificó por NP-HPLC empleando una columna μ -Porasil, hexano/AcOEt (45:55) como fase móvil y un flujo de de 1 mL/min, rindiendo las siguientes fracciones.

Fracción FDC6	H1	H2
Cantidad (mg)	14	10
t _R min	45	51
Compuesto N°	5	7

13-Deshidroxiestechólido J (1)

Sólido blanco

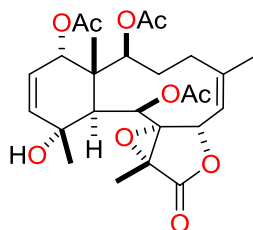
$[\alpha]_D -19.2^\circ$ (c 0.05, CH₂Cl₂)

UV (MeOH) λ_{\max} 230 nm

(+)-FABMS m/z (int. rel.)= 571 (19, [M+Na]⁺); 549 (9, [M+H]⁺) 507 (7, [M-Ac]⁺); 489 (13, [M-HOAc]⁺) ver Figura 16.

(+)-HRFABMS m/z 549.2340. Calculado para C₂₉H₃₇O₁₁, 549.2336

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ¹ H	Figura 17		67
RMN de ¹³ C y DEPT-135	Figura 18		67
Datos de ¹ H y ¹³ C		Tabla 5	73
RMN ¹ H- ¹ H NOESY.	Figura 25		71
RMN ¹ H- ¹ H COSY	Figura 20		68
RMN HSQC-Editado	Figura 21		69
RMN HMBC	Figura 22		69

2,9-Diacetil-2-desbutirilestechólido H (2)

Sólido blanco

$[\alpha]_D -69.8^\circ$ (c 0.05, CH₂Cl₂)

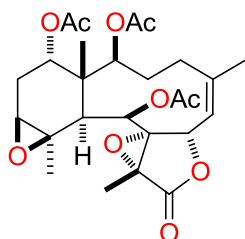
UV (MeOH) λ_{\max} 228 nm

(+)-FABMS m/z (int. rel.) 529 (10, [M+Na]⁺); 507 (7, [M+H]⁺) ver Figura 27.

(+)-HRFABMS m/z 507.2219. Calculado para C₂₆H₃₅O₁₀, 507.2230.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ^1H	Figura 28		75
RMN de ^{13}C	Figura 29		75
Datos de ^1H y ^{13}C		Tabla 6	80
RMN ^1H - ^1H COSY	Figura 31		76
RMN HSQC-Editado	Figura 32		77
RMN HMBC	Figura 34		78
RMN ^1H - ^1H NOESY	Figura 35		78

Acetato de 2 β -Acetoxi-2 (desbutiriloxi) estechólido E (3)



Sólido amorfo blanco

$[\alpha]_D = -19.2^\circ$ (c 0.05, CH_2Cl_2)

(+)-FABMS m/z (int. rel.)= 529 (11 $[\text{M}+\text{Na}]^+$); 507 (11 $[\text{M}-\text{H}]^+$), ver Figura 38.

(+)-HRFABMS m/z 507.2222. Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_{10}$, 507.2230.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ^1H	Figura 39		82
Datos de ^1H		Tabla 7	82

IV.2.2. Parte experimental de *Dysidea* sp.

Recolección de la muestra

Los especímenes de *Dysidea* sp. fueron recolectados en octubre de 1996 en la isla Mayo, en las cercanías de la isla de Sulawesi (Indonesia) (coordenadas: 1°19'699 N, 126° 25'129 E) a una profundidad de 13 metros. Después de ser conservados en MeOH se almacenaron a -20°C en el Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña, donde fue depositada una muestra bajo el código UDC96015. La identificación taxonómica de la esponja fue efectuada por la Dra. Cristina Díaz.

Extracción y fraccionamiento

Se partió de 500 g de esponja que fue extraída con MeOH varias veces. El extracto orgánico obtenido después de evaporar el disolvente, se distribuyó en dos partes iguales de agua (fracción W) y diclorometano (fracción F). Esta última fracción se evaporó a sequedad, se disolvió en MeOH:H₂O (9:1) y se extrajo con

hexano para obtener la fracción FH. La fase metanólica-acuosa resultante se llevó al 50% de MeO:H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ originando dos nuevas fracciones: la fracción de CH₂Cl₂ (FD) y la fracción metanólica-acuosa (FM). La fracción W se extrajo con *n*-butanol saturado con agua para dar la fracción butanólica (WB).

El procedimiento de extracción y fraccionamiento se detalla en los Esquema 6. Los pesos obtenidos para cada una de las fracciones fueron los siguientes:

Fracción	FH	FD	FM	WB
Cantidad (g)	1.28 g	0.767 g	-	0.373 g

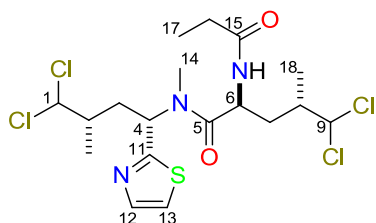
Cromatografía de la fracción FD

La cromatografía de la fracción **FD**, compuesto de 0.76 g de un aceite viscoso (ver Esquema 7), se llevó a cabo en una columna de gel de sílice (230-400 mesh) que fue eluida primero con hexano y seguidamente aumentando la polaridad con EtOAc. Las fracciones obtenidas se estudiaron por CCF utilizándose como reveladores una lámpara de luz UV a $\lambda = 254$ nm y una disolución de molibdato amónico en ácido sulfúrico al 10%, para ser reunidas en las fracciones FDC1-C5, siendo la más interesante la fracción **FDC1** (240 mg).

La fracción **FDC1** se purificó por RP-HPLC utilizando la columna μ -Bondapak C18, MeOH/H₂O (80:20) como fase móvil y un flujo de 1 mL/min para dar origen a las siguientes fracciones:

Fracción FDC1	H1	H2
Cantidad (mg)	1.2	25
Compuesto Nº	11	12

Dysitiazolamida (11)



Sólido amorfo

$[\alpha]_D = -35^\circ$ (c 0.08, CH₂Cl₂)

(+)-LR-APCIMS m/z (int. rel.) = 490/492/494 ($[M+H]^+$, 53/66/37) ver Figura 44 y Figura 45.

(+)-HR-ESIMS: m/z 490.0661, calculado para C₁₈H₂₈³⁵Cl₄N₃SO₂, 490.0656

Experimento	Figura nº	Pag.	Tabla nº	Pag.
RMN de ¹ H	Figura 46			93
RMN de ¹³ C y DEPT-135	Figura 47			93
Datos de ¹ H y ¹³ C			Tabla 8	99
RMN ¹ H- ¹ H COSY	Figura 49			94
RMN HMQC	Figura 50			95
RMN HMBC	Figura 51			95

IV.2.3. Parte experimental del anélido poliqueto *Thelepus crispus*

Recolección de la muestra

El anélido poliqueto se recolectó en el Pacífico Norte, cerca de Friday Harbor en el año 1992 y fue clasificado taxonómicamente por el Doctor Gregg Diezman del Instituto White Point Biomarine de Washington (EEUU) como *Thelepus crispus* (filo Annelida, clase Polychaeta, orden Sedentariate, familia Terebellidae). Una muestra bajo el código CBMT93311 y una foto del organismo se conserva en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de California Santa Cruz (EEUU).

Extracción y fraccionamiento

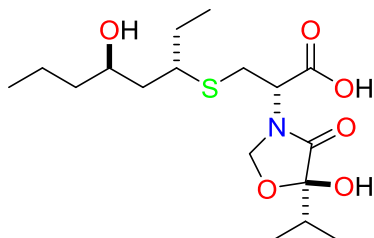
La extracción de 571 g del anélido poliqueto tres veces con MeOH rindió un extracto orgánico que después de la evaporación de disolvente se distribuyó entre dos partes iguales de agua y diclorometano para dar la fracción acuosa W y la de diclorometano F. La fracción F se evaporó a sequedad, se disolvió en MeOH:H₂O (9:1) y se extrajo con hexano para poder obtener la fracción FH. La fase metanólica-acuosa resultante se llevó al 50% de MeO:H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ originando dos nuevas fracciones: la fracción de CH₂Cl₂ (FD) y la fracción metanólica-acuosa (FM). La fracción W se extrajo con *n*-butanol saturado con agua para dar la fracción butanólica (WB) (ver Esquema 8). Los pesos de cada una de las fracciones obtenidas fueron los siguientes:

Fracción	FH	FD	FM	WB
Cantidad (g)	0.897 g	0.696 g	1.044 g	897.0 g

Cromatografía de la fracción FM

La fracción **FM** se purificó (ver Esquema 9) en una columna de Sephadex LH-20 con MeOH como fase móvil, dando lugar a cinco fracciones S1-S5, de las cuales la fracción **CBMT93311FMS3** rindió 20 mg de un compuesto puro que fue identificado como un nuevo producto natural que se denominó thelepamida. Los pesos de cada una de las fracciones obtenidas fueron los siguientes:

Fracción FM	S1	S2	S3	S4	S5
Cantidad mg	230	22	20	234	228

Thelepamida (13)

Sólido amarillo, $C_{17}H_{31}NO_6S$

$[\alpha]_D = -10.4^\circ$ (c 0.016 MeOH)

IR ν 3336, 1697, 1613 cm^{-1}

(+)-LR-ESIMS m/z : $C_{17}H_{31}NNaO_6S$ 400 $[M+Na]^+$, $C_{17}H_{30}N_2Na_2O_6S$ 422 $[M-H+2Na]^+$, $C_{17}H_{30}NKO_6S$ 416 $[M+K]^+$, $C_{17}H_{30}NNaKO_6S$ 438 $[M-H+Na+K]^+$, $C_{17}H_{30}NK_2O_6S$ 454 $[M-H+2K]^+$ ver Figura 58.

(+)-HR-ESIMS m/z : 400.1781 ($[M+Na]^+$, calculado 400.1770), 422.1594 ($[M-H+2Na]^+$, calculado 422.1589).

(-)-HR-ESIMS m/z : 376.1808 ($[M-H]^-$, calculado 376.1794).

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de 1H	Figura 59		110
RMN de ^{13}C	Figura 60		110
Datos de 1H y ^{13}C		Tabla 14	130
RMN 1H - 1H COSY	Figura 61		111
RMN HMQC	Figura 63		112
RMN HMBC	Figura 65		113
RMN HETLOC	Figura 73		119
RMN J -HMBC	Figura 74		119
RMN HSQC-HECADE	Figura 72		118
RMN 1H - 1H NOESY	Figura 71		118

IV.3 Parte experimental Capítulo II

IV.3.1 Estudio de la esponjas *A. cavernosa* recolectadas directamente de su hábitat natural

Recolección de las muestras

Todos los especímenes de la esponja *Acanthella cavernosa* fueron recolectados en las Islas Fiyi cerca de Pacific-Harbor en los arrecifes próximos a la laguna Benga a una profundidad comprendida entre los 3 y 13 metros.

Se recolectaron 0.4 kg de organismos en distintas localizaciones de Pacific Harbor (PH): 18°16'15", 178°3'15"; Pratt Reefs (PR): 18°19'44", 178°8'28"; de Benga Lagoon (BL): 18° 22'42", 178°5'40" y Sulfur Passage (SP): 18°21'33", 178°11'17". Los especímenes se preservaron en una mezcla de *n*-PrOH:H₂O (1:1) y fueron transportados a los laboratorios de la Universidad de California (Santa Cruz, EEUU) para su estudio, codificados bajo el código 92002.

Extracción y fraccionamiento

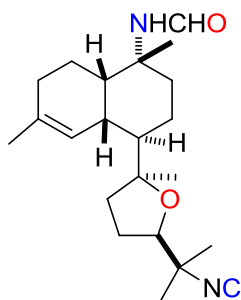
La extracción varias veces con MeOH de 0.4 kg de de las esponja *A. cavernosa* recolectadas directamente de su hábitat natural, rindió, después de eliminar el disolvente, 49.31 g de un extracto orgánico. El extracto metanólico se distribuyó entre dos partes iguales de diclorometano y agua para dar lugar a la la fracción de diclorometano F y fracción acuosa W. La fracción F se evaporó a sequedad, se disolvió en MeOH:H₂O (9:1) y se extrajo con hexano para poder obtener la fracción FH. La fase metanólica-acuosa se llevó al 50% de MeO:H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ originando dos nuevas fracciones; la fracción de CH₂Cl₂ (FD, 853.8 g)) y la fracción metanólica-acuosa (FM). La fracción W se extrajo con *n*-butanol saturado con agua para dar la fracción butanólica (WB) (ver Esquema 10).

Cromatografía líquida de alta eficacia de la fracción FD

La separación de la fracción FD (853.8 mg) se realizó por RP-HPLC utilizando una columna ODS-C18, una mezcla de MeOH:H₂O (75:25) y un flujo de 1.0 mL/min, rindiendo las siguientes fracciones:

Fracción FD'	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
Cantidad (mg)	15.8	1.2	12.6	29.9	12	2.0	12.4	1.3	12.1	30.0
t _R (min)	8	10	13	15	15.5	16	17	18	19	28
Compuesto N°	22	16	17	14	18	19	21	20	15	23

10-Formamidokalihineneno (14)



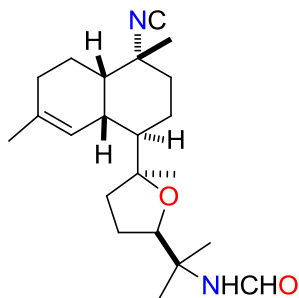
Sólido incoloro.

HRFABMS m/z 359.2693 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{22}H_{35}N_2O_2$, 359.2699) ver Figura 88.

IR ν 3350, 2968, 2127, 1679, 1530 cm^{-1} .

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de 1H	Figura 91		153
RMN de ^{13}C	Figura 90		152
Datos de 1H y ^{13}C		Tabla 18	156
RMN 1H - 1H COSY	Figura 92		153
RMN 1H - 1H NOESY	Figura 93 y Figura 94		154
RMN HMQC	Figura 95		155

15-Formamidokalihineneno (15)

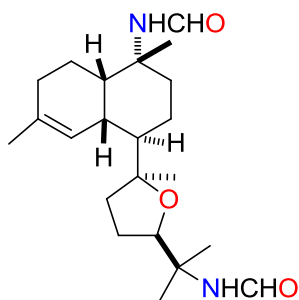


Sólido incoloro.

IR ν 3330, 2970, 2129, 1677 cm^{-1} .

HRFABMS m/z 359.2690 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{22}H_{35}N_2O_2$, 359.2699) ver Figura 96.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de 1H	Figura 97		157
Datos de 1H		Tabla 19	159
RMN ^{13}C	Figura 98		158

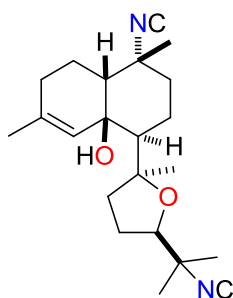
10,15-Bisformamidokalihineneno (16)

Sólido incoloro.

IR ν 3350, 2130, 2965, 1677, 1532 cm^{-1}

(+)-HRFABMS m/z 377.2794, $[M+H]^+$ (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3$, 377.2804) Figura 99.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ^1H	Figura 100		160
Datos de ^1H		Tabla 20	161

6-hidroxikalihineneno (17)

Sólido en forma de agujas transparentes.

IR ν 3350, 2965, 2128, 1660, 1532 cm^{-1} .

(+)-HRFABMS m/z 511.2678 $[M+\text{Magic Bullet}+H]^+$ (Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, 511.2664) ver Figura 101.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ^1H	Figura 102		162
Datos de ^1H		Tabla 21	166
RMN ^{13}C , DEPT-90	Figura 104		163
DEPT-135	Figura 105		164
RMN ^1H - ^1H COSY	Figura 106		164
Rayos X	Figura 107		165

Tabla 52. Crystal data and structure refinement for **17**.

Identification code	6-hydroxykalihinene
Empirical formula	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₂
Formula weight	356.5
Temperature	293(2) K
Wavelength	1.54178 Å
Crystal system	Orthorombic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions	a - 12.5950(10) Å α -90° b - 12.790(2) Å β -90° c - 13.369(2) Å γ -90°
Volume	2153.6(5) Å ³
z	4
Density (calculated)	1.100 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.548 mm ⁻¹
F(000)	776
Crystal size	0.06 x 0.25 x 0.30 mm
θ range for data collection	4.78 to 55.020
Index ranges	-1 ≤ h ≤ 13, -1 ≤ k ≤ 13, -1 ≤ l ≤ 13
Reflections collected	1912
Independent reflections	1785 (R _{int} 0.0349)
Refinement method	Full- matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	1783/0/236
Goodness-of-fit on F ²	1.002
Final R indices [I>20(I)]	R1 0.0521, wR2 0.1363
R indices (all data)	R1 0.0687, wR2 0.1508
Absolute structure parameter	2.2(7)
Extinction coefficient	0.0021(6)
Largest diff, peak and hole	0.314 and -0.143 eÅ ⁻³

Tabla 53. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10$) for 17. U(eq) is defined as one third of the trace of trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

Atom	x	y	z	U(eq)
O(1)	634(3)	5795(3)	1045(2)	62(1)
O(2)	621(3)	5000(2)	3643(2)	65(1)
N(1)	-319(4)	7682(3)	5514(3)	62(1)
N(2)	87(4)	7479(4)	-327(3)	76(1)
C(1)	-540(4)	6457(4)	4114(3)	46(1)
C(2)	-1384(4)	7192(4)	3687(4)	59(1)
C(3)	-2262(4)	6556(5)	3175(4)	78(2)
C(4)	-1846(4)	5680(4)	2561(4)	61(1)
C(5)	-854(4)	5402(4)	2585(4)	53(1)
C(6)	0(3)	5850(3)	3247(3)	47(1)
C(7)	801(4)	6566(4)	2684(3)	45(1)
C(8)	1575(4)	7078(4)	3409(4)	59(1)
C(9)	1018(4)	7695(4)	4239(4)	58(1)
C(10)	258(4)	7002(3)	4815(3)	48(1)
C(11)	1409(4)	6083(4)	1784(3)	52(1)
C(12)	2078(4)	6899(4)	1235(3)	66(2)
C(13)	2079(4)	6515(5)	145(4)	74(2)
C(14)	1045(4)	5909(4)	56(3)	58(1)
C(15)	194(5)	6377(4)	-607(4)	61(1)
C(16)	518(6)	6322(5)	-1706(3)	89(2)
C(17)	-882(5)	5852(5)	-442(4)	79(2)
C(18)	2095(5)	5132(5)	2043(4)	79(2)
C(19)	-2665(4)	5154(5)	1890(4)	88(2)
C(20)	863(4)	6239(4)	5492(4)	70(2)
C(21)	-691(5)	8218(5)	6110(5)	83(2)
C(22)	56(5)	8336(5)	-89(6)	100(2)

Tabla 54. Bond lengths [Å] and angles [°] for **17**

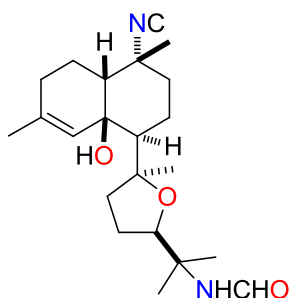
O(1)–C(14)	1.427(5)	O(1)–C(11)	1.436(5)
O(2)–C(6)	1.440(5)	N(1)–C(21)	1.151(6)
N(1)–C(10)	1.469(6)	N(2)–C(22)	1.142(7)
N(2)–C(15)	1.465(8)	C(1)–C(2)	1.530(6)
C(1)–C(6)	1.552(6)	C(1)–C(10)	1.541(6)
C(2)–C(3)	1.534(7)	C(3)–C(4)	1.484(7)
C(4)–C(5)	1.299(6)	C(4)–C(19)	1.524(7)
C(5)–C(6)	1.506(6)	C(6)–C(7)	1.557(6)
C(7)–C(8)	1.523(6)	C(7)–C(11)	1.554(6)
C(8)–C(9)	1.531(6)	C(9)–C(10)	1.515(6)
C(10)–C(20)	1.534(6)	C(11)–C(12)	1.529(6)
C(11)–C(18)	1.532(7)	C(12)–C(13)	1.539(7)
C(13)–C(14)	1.520(7)	C(14)–C(15)	1.515(7)
C(15)–C(16)	1.527(6)	C(15)–C(17)	1.528(7)
C(14)–O(1)–C(11)	111.3(3)	C(21)–N(1)–C(10)	174.0(5)
C(22)–N(2)–C(15)	176.5(7)	C(2)–C(1)–C(6)	109.4(4)
C(2)–C(1)–C(10)	113.7(4)	C(6)–C(1)–C(10)	113.3(4)
C(3)–C(2)–C(1)	110.0(4)	C(4)–C(3)–C(2)	113.1(4)
C(5)–C(4)–C(3)	122.2(5)	C(5)–C(4)–C(19)	123.0(5)
C(3)–C(4)–C(19)	114.8(4)	C(4)–C(5)–C(6)	126.7(5)
O(2)–C(6)–C(5)	108.5(4)	O(2)–C(6)–C(1)	109.9(3)
C(5)–C(6)–C(1)	108.4(4)	O(2)–C(6)–C(7)	105.6(3)
C(5)–C(6)–C(7)	113.8(4)	C(1)–C(6)–C(7)	110.6(4)
C(8)–C(7)–C(11)	110.4(4)	C(8)–C(7)–C(6)	111.1(3)
C(11)–C(7)–C(6)	117.4(4)	C(9)–C(8)–C(7)	112.9(4)
C(10)–C(9)–C(8)	110.9(4)	N(1)–C(10)–C(9)	106.8(4)
N(1)–C(10)–C(20)	104.3(4)	C(9)–C(10)–C(20)	111.0(4)
N(1)–C(10)–C(1)	109.4(4)	C(9)–C(10)–C(1)	111.5(4)
C(20)–C(10)–C(1)	113.3(4)	O(1)–C(11)–C(12)	102.7(4)
O(1)–C(11)–C(18)	109.6(4)	C(12)–C(11)–C(18)	109.8(4)
O(1)–C(11)–C(7)	107.4(3)	C(12)–C(11)–C(7)	111.8(4)
C(18)–C(11)–C(7)	114.7(4)	C(11)–C(12)–C(13)	103.7(4)
C(14)–C(13)–C(12)	103.7(4)	O(1)–C(14)–C(15)	109.0(4)
O(1)–C(14)–C(13)	106.9(4)	C(15)–C(14)–C(13)	116.8(5)
N(2)–C(15)–C(14)	107.2(4)	N(2)–C(15)–C(16)	108.3(5)
C(14)–C(15)–C(16)	110.8(4)	N(2)–C(15)–C(17)	107.8(4)
C(14)–C(15)–C(17)	111.7(4)	C(16)–C(15)–C(17)	110.8(5)

Tabla 55 . Anisotropic displacement [$\text{\AA}^2 \times 10^3$] for **17**.

Atom	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O (1)	64 (2)	73 (2)	48 (2)	-3 (2)	9 (2)	-14 (2)
O (2)	71 (2)	47 (2)	76 (2)	13 (2)	4 (2)	13 (2)
N (1)	73 (3)	56 (3)	59 (3)	-4 (2)	2 (3)	0 (2)
N (2)	88 (3)	61 (3)	79 (3)	-10 (3)	3 (3)	14 (3)
C (1)	48 (2)	44 (2)	47 (3)	7 (2)	7 (2)	2 (3)
C (2)	52 (3)	54 (3)	71 (3)	-4 (3)	-1 (3)	10 (3)
C (3)	59 (3)	97 (4)	79 (4)	-20 (4)	-5 (3)	11 (4)
C (4)	51 (3)	69 (3)	62 (3)	-9 (3)	-1 (3)	-9 (3)
C (5)	58 (3)	48 (3)	54 (3)	-2 (3)	8 (3)	-8 (3)
C (6)	45 (3)	42 (2)	54 (3)	0 (2)	-3 (2)	1 (2)
C (7)	42 (2)	42 (2)	50 (3)	6 (2)	1 (2)	4 (2)
C (8)	54 (3)	62 (3)	62 (3)	-5 (3)	-4 (3)	-9 (3)
C (9)	62 (3)	54 (3)	58 (3)	-9 (3)	-8 (3)	-2 (3)
C (10)	56 (3)	42 (3)	46 (3)	1 (2)	1 (3)	3 (2)
C (11)	44 (3)	53 (3)	59 (3)	-6 (3)	3 (3)	2 (3)
C (12)	59 (3)	75 (4)	64 (3)	-4 (3)	13 (3)	-4 (3)
C (13)	68 (3)	82 (4)	73 (4)	1 (3)	23 (3)	8 (4)
C (14)	68 (3)	59 (3)	48 (3)	0 (3)	17 (3)	4 (3)
C (15)	90 (4)	48 (3)	45 (3)	-5 (2)	14 (3)	13 (3)
C (16)	130 (5)	85 (4)	51 (3)	4 (3)	15 (4)	13 (5)
C (17)	86 (4)	81 (4)	70 (3)	-2 (3)	-7 (3)	-10 (4)
C (18)	81 (4)	72 (4)	85 (4)	-1 (3)	4 (4)	25 (4)
C (19)	65 (3)	109 (5)	90 (4)	-26 (4)	-7 (3)	-21 (4)
C (20)	83 (4)	66 (3)	60 (3)	7 (3)	-16 (3)	10 (3)
C (21)	95 (4)	74 (4)	81 (4)	-23 (4)	11 (4)	3 (4)
C (22)	108 (5)	67 (4)	125 (6)	-23 (4)	5 (5)	9 (4)

Tabla 56. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters [$\text{\AA}^2 \times 10$] for **17**.

Atom	x	y	z	U (eq)
H (2)	238 (3)	4613 (2)	3972 (2)	97
H (1)	-917 (4)	5937 (4)	4519 (3)	56
H (2A)	-1687 (4)	7609 (4)	4221 (4)	70
H (2B)	-1061 (4)	7663 (4)	3206 (4)	70
H (3A)	-2734 (4)	6276 (5)	3683 (4)	94
H (3B)	-2675 (4)	7017 (5)	2750 (4)	94
H (5)	-651 (4)	4872 (4)	2149 (4)	64
H (7)	378 (4)	7138 (4)	2404 (3)	54
H (8A)	2015 (4)	6541 (4)	3711 (4)	71
H (8B)	2038 (4)	7546 (4)	3040 (4)	71
H (9A)	1544 (4)	7980 (4)	4693 (4)	70
H (9B)	629 (4)	8274 (4)	3946 (4)	70
H (12A)	2794 (4)	6925 (4)	1502 (3)	79
H (12B)	1761 (4)	7588 (4)	1287 (3)	79
H (13A)	2094 (4)	7098 (5)	-318 (4)	89
H (13B)	2685 (4)	6066 (5)	15 (4)	89
H (14)	1213 (4)	5210 (4)	-199 (3)	70
H (16A)	-32 (6)	6622 (5)	-2113 (3)	133
H (16B)	623 (6)	5605 (5)	-1895 (3)	133
H (16C)	1166 (6)	6704 (5)	-1803 (3)	133
H (17A)	-1402 (5)	6168 (5)	-871 (4)	119
H (17B)	-1093 (5)	5937 (5)	244 (4)	119
H (17C)	-827 (5)	5120 (5)	-595 (4)	119
H (18A)	1671 (5)	4623 (5)	2387 (4)	119
H (18B)	2672 (5)	5346 (5)	2465 (4)	119
H (18C)	2373 (5)	4831 (5)	1439 (4)	119
H (19A)	-3345 (4)	5478 (5)	1987 (4)	132
H (19B)	-2711 (4)	4425 (5)	2056 (4)	132
H (19C)	-2455 (4)	5228 (5)	1203 (4)	132
H (20A)	366 (4)	5810 (4)	5849 (4)	105
H (20B)	1287 (4)	6626 (4)	5961 (4)	105
H (20C)	1315 (4)	5804 (4)	5091 (4)	105

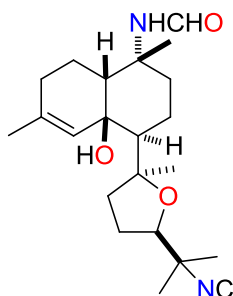
6-hidroxi-15-formamidokalihineneno (18)

Sólido incoloro. $C_{22}H_{34}N_2O_3$

IR ν 3347, 2980, 2129, 1680, 1532 cm^{-1} .

HRFABMS m/z = 529.2778, $[M+Magic\ Bullet+H]^+$ (Calculado para $C_{26}H_{45}N_2O_5S_2$, 529.2770) ver Figura 108.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de 1H	Figura 109		168
Datos de 1H		Tabla 22	169
RMN ^{13}C	Figura 110		168

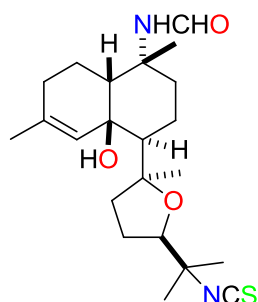
6-hidroxi-10-formamidokalihineneno (19)

Sólido amorfo.

IR ν 3350, 2965, 2131, 1676, 1529 cm^{-1} ver Figura 113.

HRFABMS m/z 375.2635, $[M+H]^+$ (Calculado para $C_{22}H_{33}N_2O_3$, 375.2648) ver Figura 111.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de 1H	Figura 112		170
Datos de 1H		Tabla 24	172

6-hidroxi-10-formamido-15-isotiocianokalihineno (20)

Sólido amorfo.

IR ν 3350, 2965, 2131, 2120, 1676, 1529 cm^{-1} ver Figura 115.

HRFABMS m/z 407.2362 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, 407.2368) ver Figura 114.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
Datos de ^1H		Tabla 25	174

IV.3.2 Estudio de la esponjas *A. cavernosa* cultivadas.**IV.3.2.1 Sistema de acuicultura empleado en el cultivo de la esponja *Acanthella cavernosa*****Tanque de crecimiento de las esponjas**

Se utilizó el sistema Aqua-Pharm System IITM de la empresa CalBiomarine. Este sistema consiste en dos tanques de 1515 litros (de medida 1.8 x 0.9 x 0.9 metros) recubiertos de fibra de vidrio que están conectados en línea con un equipo de circulación y filtración de agua. Las esponjas se ataron a unas pequeñas placas perforadas de PVC, colocándolas verticalmente en forma de panal de abejas, que fue la forma observada en el hábitat natural en el que se recolectaron.

El efecto de corrientes marinas para cada tanque se creó mediante un distribuidor hidráulico, que se dividía en dos tuberías de PVC, una al final y la otra en la mitad del tanque. Cada una de ellas producía ocho chorros paralelos de agua a propulsión que cruzaban a gran velocidad toda la superficie del tanque, creando una fuerte corriente en cada uno de los tanques.

En el fondo de los tanques se colocó una capa de coral marino natural en forma de pequeñas bolas que ayudaba a mantener el pH del agua, así como biofiltros de los desechos de las partículas de alimento de las esponjas.

El 15% del agua de los tanques se cambiaba cada semana por agua fresca del mar con el fin de limpiar los componentes tóxicos que se podían producir y de reemplazar además los microorganismos naturales del mar.

Las esponjas se alimentaron con una dieta mixta de microalgas vivas, bacteria liofilizada y una alimentación en polvo que fue la misma que se utiliza para alimentar larvas en acuicultura.

Tanque de realización de los protocolos

Consistió en un tanque de capacidad de 1515 litros de agua, en el que se montaron unos estantes donde se colocaron 120 acuarios individuales de pexiglass de siete litros de capacidad. En cada uno de ellos se colocó una capa de bolas de coral de 1.5 cm de espesor. Cada acuario tenía su propio suministro con flujo de agua salada de 5.6 L/min. Sobre cada estante y encima de los acuarios individuales se colocaron las lámparas que se utilizaron para aplicar los protocolos con luz (ver Figura 83).

La alimentación de las esponjas en el tanque empleado para el tratamiento con los protocolos diseñados fue igual que en el tanque de crecimiento.

Recolección de las muestras

Se recolectaron 109 especímenes de la esponja *A. cavernosa* en las Islas Fiyi de Oceanía en el Océano, Pacífico cerca de Pacific Harbor en los arrecifes próximos a la laguna Benga durante noviembre 1992. Todas las esponjas fueron recolectadas a una profundidad entre 3 y 13 metros. La recolección de especímenes individuales se realizó en los arrecifes de coral de las localizaciones de Pacific Harbor (PH): 18°16'15", 178°3'15"; Pratt Reefs (PR): 18°19'44", 178°8'28"; de Benga Lagoon (BL): 18° 22'42", 178°5'40" y Sulfur Passage (SP): 18°21'33", 178°11'17". Se mantuvieron separadas por individuos y se codificaron según las localizaciones Pacific Harbor PH-232A, 148A; Pratt Reefs PR-90, 155A, 48A, 36A, 124A, 9A, 127A, 113A, 156A, 43A, BL-140A, 136A; Sulfur Passage SP-78A.

A pesar de todas estas precauciones, cuando llegaron al laboratorio de CalBiomarine en Los Angeles, las esponjas tenían una concentración de oxígeno cercana a cero por lo que se habían deteriorado ligeramente. Se trasvasaron a un tanque donde se aclimataron, controlando la temperatura del agua. Con el fin de que se recuperaran, se hiperoxigenaron y se limpiaron de bacterias y algas con un cepillo. Variando la temperatura del agua, se consiguió controlar la presencia de hongos y después de veintiún días, se comenzó una alimentación compuesta de microalgas vivas y bacterias liofilizadas. Se mantuvieron en ese acuario durante siete meses antes de su extracción.

Acuicultura

Los especímenes se crecieron en el sistema de acuicultura Aqua-Pharm System IITM en el laboratorio de la empresa CalBioMarine Technologies, Inc. en Carlsbad, California (EEUU) durante siete meses. A continuación, se cogieron 40 de ellas, se dividieron a la mitad, se sometieron a los protocolos determinados durante un mes (Esquema 12 y Esquema 13) y después se procedió a su estudio químico.

Protocolo 1: Luz intensa y daño en el tejido celular

Después de haber sido cultivadas las esponjas durante siete meses en el laboratorio se seleccionaron cuarenta especímenes y se dividieron a la mitad. Cuarenta de estas mitades de esponjas se las nombró P1A Inicial y se procedió a su estudio químico.

Las otras cuarenta mitades se repartieron en grupos de 10 y se sometieron a los siguientes protocolos:

P1B.1 Luz

Diez mitades se colocaron en los acuarios independientes provistos de unas lámparas que producían una intensidad luminosa de $280 \mu\text{molquinto}/\text{m}^2\text{s}^2$. Recibieron 24 horas de luz durante 15 días. Luego se procedió a su estudio químico.

P1B.2 Daño

Se realizaron cortes sobre la superficie de cada una de estas 10 mitades de esponjas con una cuchilla dos veces al principio y quince días más tarde otra vez. Luego se procedió a su estudio químico.

P1B.3 Luz y daño

Se realizaron cortes sobre la superficie de cada una de estas 10 mitades de esponjas con una cuchilla dos veces al principio de este experimento y quince días después. Además durante estas dos semanas se sometieron a ciclos de luz intensa de 12 horas. Luego se procedió a su estudio químico.

P1B.4 Control 1

Las últimas 10 mitades de esponjas se dejaron 15 días en los acuarios recibiendo luz de fondo. Luego se procedió a su estudio químico.

Protocolo 2: Exprimir las esponjas

Se cogieron otras 32 esponjas crecidas en acuicultura y se colocaron en el mismo acuario y se separaron en dos grupos de 16 esponjas.

P2.1 Control 2

Uno de los grupos se dejó en el acuario sin someterlas a ningún proceso.

P2.2 Exprimidas

Se exprimió el jugo de las otras 16 y se pusieron en el acuario de nuevo. Se exprimieron dos veces, una al principio y otras dos semanas más tarde. Luego se procedió a su estudio químico.

Protocolo 3: Luz intensa

Diez esponjas se separaron en dos grupos de cinco especímenes.

P3.1 Luz Intensa

Cinco de ellas se sometieron durante una semana a 24 h de luz intensa con unas lámparas de 300 vatios con una radiación de $280 \mu\text{molquinto}/\text{m}^2\text{s}^2$ a temperatura constante (27.2°C). Luego se procedió a su estudio químico.

P3.2 Ausencia total de luz

Las otras cinco esponjas estuvieron en oscuridad total una semana. Luego se procedió a su estudio químico.

Protocolo 4: Inducción química

P4.1 Inducción química

Las esponjas sanas que fueron inducidas químicamente se estudiaron individualmente.

P4.2 Inductor químico

Cinco esponjas fueron troceadas en pequeños fragmentos ($<1 \text{ cm}^3$) y se colocaron por períodos de cinco horas al lado de otras esponjas no sometidas a ningún protocolo. Se realizó esta rutina durante cuatro días. Las esponjas troceadas se juntan para su estudio.

Después de un período de siete meses de tratamientos se obtuvo un 81% de supervivencia de las esponjas. De las esponjas denominadas línea base, se obtuvo la fracción FD, la cual supuso el 15% aproximado del peso de la esponjas, mientras que la que contenía los tres kalihinenos mayoritarios supuso el 0.48%.

IV.3.2.2 Extracción y fraccionamiento

Cada esponja se extrajo con MeOH y se realizó un estudio sobre la cantidad de extracto que se obtenía en cada extracción. Se extrajeron los especímenes hasta cinco veces, comprobándose que en las dos primeras extracciones se obtenía prácticamente la cantidad máxima de extracto (99%) mientras que en las extracciones posteriores sólo se obtenían cantidades insignificantes (1%) (ver Tabla 58).

Tabla 57. Peso de las fracciones obtenidas en diferentes extracciones de la esponja.

Fracción g	1ª Extracción	2ª Extracción	3ª Extracción	4ª Extracción	5ª Extracción
F (CH_2Cl_2) g	1.95	1.80	0.360	0.112	0.042
FD (CH_2Cl_2) g	1.01	0.134	0.019	0.002	0.003

Tabla 58. Peso de las fracciones obtenidas en diferentes extracciones de la esponja.

Fracción g	1ª Extracción	2ª Extracción	3ª Extracción	4ª Extracción	5ª Extracción
F (CH_2Cl_2) g	1.08	0.682	0.160	0.260	0.148
FD (CH_2Cl_2) g	0.853	0.134	0.003	0.003	0.003

Cada extracto se fraccionó siguiendo el mismo esquema de partición (Esquema 10) utilizado en el estudio de las esponjas recolectadas en su hábitat natural, obteniéndose las siguientes cantidades.

Tabla 59. Cantidades obtenidas de los extractos de extraer diez esponjas.

NºEsponja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F(g)	0.317	0.707	0.366	0.241	0.181	0.154	0.369	0.250	0.323	0.606
FD(g)	0.046	0.051	0.063	0.041	0.027	0.050	0.047	0.076	0.067	0.109

Cromatografía de las fracciones FD

Para cada uno los tres kalihinenos a analizar **15**, **21**, **23** se obtuvieron las curvas de calibración. Para ello se utilizó un detector de índice de refracción midiéndose las áreas bajo los picos de los cromatogramas de

HPLC que mostró cada uno de los compuestos con cinco concentraciones conocidas de cada uno de ellos. Se determinó también la cantidad mínima detectable para cada compuesto que fueron las siguientes:

15-Formamidokalihinenol (15) 0.002 mg

Kalihinol A (21) 0.0006 mg

Kalihinenol (23) 0.10 mg

Las fracciones FD obtenidas a partir de los extractos de los especímenes sometidos a cada uno de los protocolos diseñados (Inicial, Luz y Daño, Daño, Luz, Exprimidas, Control, Fuente, Objetivo, Fuente) se sometieron a un estudio de RP-HPLC utilizando una columna Regis C18 (250x4.6 mm, 300 Å, y 5 µm tamaño de partícula analítica, una mezcla de MeOH:H₂O (75:25) como fase móvil y un flujo de 1 mL/min. Los cromatogramas obtenidos se analizaron con el programa de software EZChrome y dieron lugar a una serie de resultados que se representan en las Gráficas 1-8.

Método de Bradford para la cuantificación del contenido proteico. (Realizado por Calbiomarine Tech.).

Para esta determinación se utilizó el ensayo de la casa comercial Bio-Rad Kit N. 1. La curva de calibración se preparó con la globulina bovina gamma (BGG). La esponja seca después de ser extraída, se liofilizó y se redisolvió con NaOH 1N a 90°C durante 30 minutos. De esta manera se consiguió un extracto proteico que se neutralizó con HCl 1N. Para establecer la curva de calibración se utilizaron 5 puntos de concentración conocida de BGG, y midiendo la absorbancia a 595 nm.

IV.4 Parte experimental Capítulo III.

Determinación de la estructuras de productos naturales marinos bioactivos de esponjas a partir de mezclas de compuestos

IV.4.1 Parte experimental de la esponja *Jaspis cf coricea*

Recolección de la muestra

La esponja *Jaspis. cf. coricea* (número colección 90187) fue recogida en Boi-Boi, en la isla de Waga en Papua Nueva Guinea en julio de 1990. Es una esponja incrustante con un grosor de 0.5-2 cm, de color amarillo-anaranjado que después de ser recolectada torna a color marrón. El estudio taxonómico de la esponja fue realizado por el profesor Rob van Soest y la Dra. María Cristina Díaz. Existe una foto y una muestra en el Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de California, Santa Cruz, (EEUU).

Extracción y fraccionamiento

La esponja *Jaspis. cf. coricea* (16.8 g de organismo seco) se extrajo tres veces con MeOH para dar, después de eliminar el disolvente, 3.2 g de un aceite que se distribuyó entre diferentes disolventes siguiendo el esquema general de fraccionamiento (Esquema 15). Las fracciones obtenidas con sus pesos respectivos son las siguientes:

Fracción	FH	FD	FM	WB
Cantidad (g)	0.8 g	0.66 g	0.79 g	0.95g

Cromatografía de la fracción FD

La separación cromatográfica de la fracción FD en una columna de gel de sílice (300-400 Mesh) usando un gradiente de CH₂Cl₂ en MeOH dio lugar a cinco fracciones (Esquema 16). La purificación de la fracción denominada FDF7 por RP-HPLC, usando una mezcla de MeOH:H₂O (8:2) como fase móvil, rindió tres fracciones, FDF7H2H1, FDF7H2H2 y FDF7H3H2, que no pudieron ser separadas, después de sucesivos intentos, por lo que se estudiaron como mezclas sin llegar a aislar los compuestos puros. Los pesos de las fracciones-mezcla obtenidas y los compuestos identificados en cada una de ellas, fueron los siguientes:

Fracción	Mezcla FDF7H2H1	Mezcla FDF7H2H2	Mezcla FDF7H3H2
Cantidad (mg)	25.6 mg	32.2mg	33.6mg
Nº Compuesto	24, 26, 28	24, 30	25, 27,29,30

IV.4.1.1 Hidrólisis de las fracciones-mezclas FDF7H2H1, FDF7H2H2 y FDF7H3H2

10 mg de cada una de las fracciones mezcla FDF7H2H1, FDF7H2H2 y FDF7H3H2 se disolvieron en 1.1 mL de 1% KOH/MeOH en un matraz de fondo redondo provisto de un agitador. Después de someterlos a agitación durante 48 horas a temperatura ambiente, se neutralizó cada una con 1% de HCl, y a la mezcla resultante se le añadió 4 mL de H₂O y se extrajo 3 veces con 4 mL de CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos se reunieron, se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron a sequedad, obteniéndose los ésteres metílicos del ácido mirístico y del 13-metilmirístico.

Éster metílico del ácido mirístico

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ_H 3.70 (s, 3H, OMe), 2.38 (t, *J* = 7.5 Hz), 1.60 (m), 1.30 (m), 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz)

RMN ¹³C: δ_C 175.3, 35.7, 25.7, 30.0, 33.1, 23.7, 14.0.

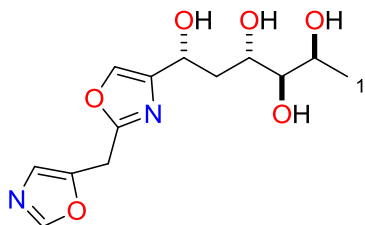
Ester metílico del ácido 13-metilmirístico.

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ_H 3.70 (s, 3H, OMe), 2.38 (t, *J* = 7.5 Hz), 1.60 (m), 1.30 (m), 1.30 (m), 0.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H)

RMN ¹³C: δ_C 175.4, 35.8, 25.7, 30.0, 28.5, 40.2, 29.1, 23.0.

La fracción acuosa resultante de la extracción de cada una de las hidrólisis básicas, se llevó a sequedad, se disolvió en MeCN-MeOH (1:1) y se filtró. El residuo resultante se purificó RP-HPLC usando una columna 10 μm ODS y una mezcla de MeCN:H₂O(15:85) como fase móvil, obteniéndose en los tres casos, el mismo compuesto que una vez identificado se denominó como bengazol Z (**33**).

Bengazol Z (**33**)



Sólido amorfo, C₁₃H₁₈N₂O₆.

[α]_D -2.5 (c 0.008 g/100mL, MeOH)

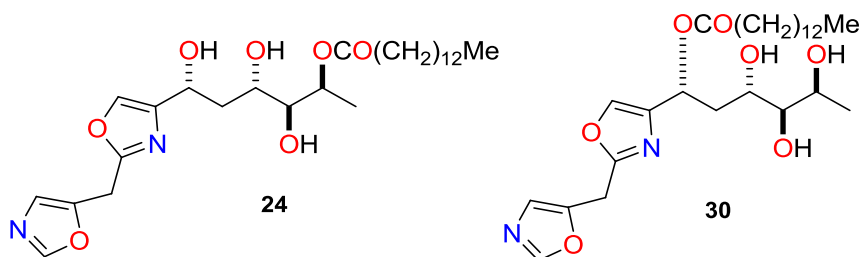
UV (MeOH) λ_{max} = 224, 278 nm

(+)-FABMS *m/z* (matriz de glicerol) 299 [M+Na]⁺; 281 [M+H-H₂O]⁺.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ¹ H	Figura 119		207
Datos de RMN ¹ H y ¹³ C		Tabla 28	210
RMN ¹³ C	Figura 120		208
RMN ¹ H- ¹ H COSY	Figura 121		209

Composición de la fracción-mezcla FDF7H2H2

Bengazol C₂ (24) y bengazol C₆ (30)



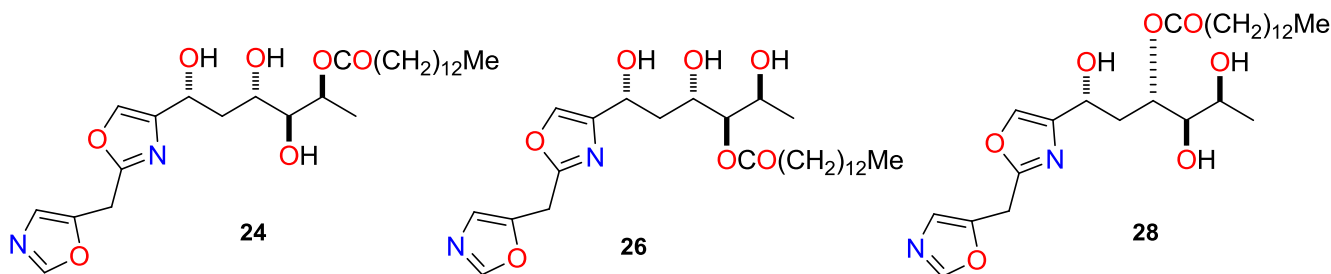
Sólido amorfo, C₂₇H₄₄N₂O₇

(+)-LRFAB m/z (int rel.) 509 ([M+H]⁺, 10) ver Figura 122.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ¹ H	Figuras 123 y 124		212, 213
RMN ¹³ C	Figura 125		213
RMN ¹ H- ¹ H COSY	Figura 126		214
Datos de ¹ H y ¹³ C Bengazol C ₂ (24)		Tabla 30	215
Datos de ¹ H y ¹³ C Bengazol C ₆ (30)		Tabla 31	215

Composición de la fracción-mezcla FDF7H2H1

Bengazol C₂ (24), bengazol C₃ (26) y bengazol C₄ (28)



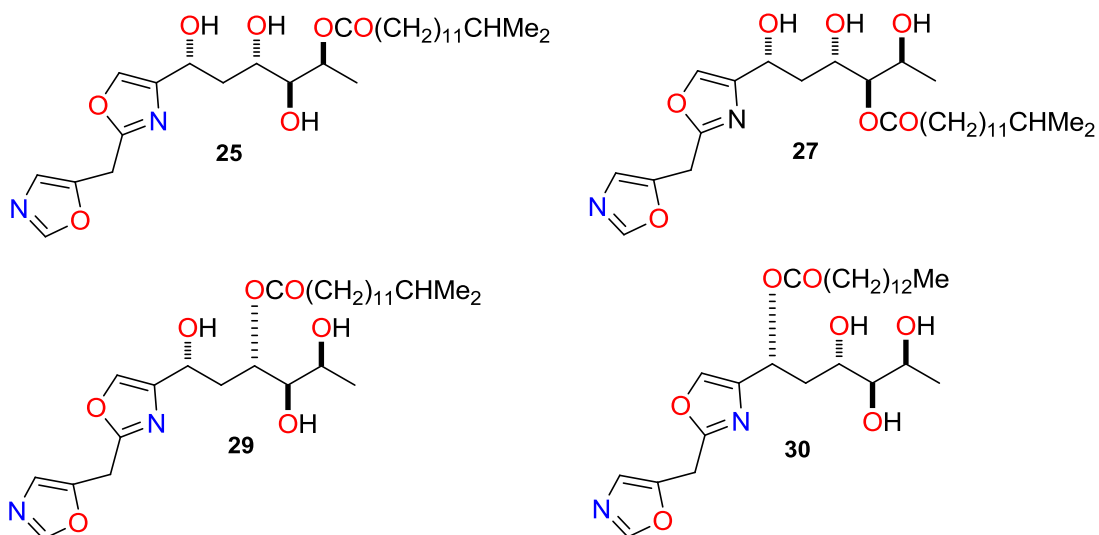
Sólido amorfo, C₂₇H₄₄N₂O₇.

IRFAB m/z (int rel.) 509 ([M+H]⁺, 23) ver Figura 127.

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ¹ H	Figuras 128 y 129		217
RMN ¹³ C	Figura 130		218
RMN ¹ H- ¹ H COSY	Figura 133		220
Datos de ¹ H y ¹³ C Bengazol C ₂ (24)		Tabla 30	215
Datos de ¹ H y ¹³ C Bengazol C ₃ (26)		Tabla 32	221
Datos de ¹ H y ¹³ C Bengazol C ₄ (28)		Tabla 33	221

Composición de la fracción-mezcla FDF7H2H1

Bengazol D₂ (25), bengazol D₃ (27), bengazol D₄ (29) y bengazol C₆ (30)



Sólido amorfo, C₂₇H₄₄N₂O₇.

IRFAB m/z (int rel.) 509 ([M+H]⁺, 20)

Experimento	Figura nº	Tabla nº	Página nº
RMN de ¹ H	Figura 134		222
RMN ¹³ C, DEPT 135	Figura 141		228
RMN ¹ H- ¹ H COSY	Figura 139		227
¹ H- ¹³ C HETCOR (J=145 Hz)	Figura 140		225
Amp. ¹ H- ¹³ C HETCOR (J= 9 Hz)	Figura 142		229
Datos de ¹ H y ¹³ C bengazol D ₂ (25)		Tabla 36	229
Datos de ¹ H y ¹³ C bengazol D ₃ (27)		Tabla 37	230
Datos de ¹ H y ¹³ C bengazol D ₄ (29)		Tabla 38	230
Datos de ¹ H y ¹³ C bengazol C ₆ (30)		Tabla 31	215

IV.4.2 Parte experimental de los tunicados *Aplidium falklandicum* y *Aplidium meridianum*

Recolección de la muestra

Los tunicados del género *Aplidium* fueron recolectados por el grupo de investigación coordinado por la Dr Contxita Avila entre noviembre 2003 y enero 2004 al este del Mar de Weddell en la Antártida a una profundidad de 280 y 340 m. La recolección se llevó a cabo por medio del sistema llamado “Bottom and Agassiz Trawls”, que consiste en una red unida a un marco metálico de forma perpendicular que se arrastra recogiendo los organismos por el fondo marino durante tres minutos. En la siguiente tabla se muestran los organismos recogidos y donde fueron recolectados.

Tabla 60. Ascidiás estudiadas

Nombre	N. de Muestra	Código*	Nº Colonias	Latitud	Longitud	Profundidad(m)
<i>A. falklandicum</i>	1	#180	5	70° 55.92'S	10° 32.37'W	288
<i>A. falklandicum</i>	2	#410	2	70° 56.67'S	10° 32.05'W	302.4
<i>A. falklandicum</i>	3	#972	14	70° 52.16'S	10° 43.69'W	290.8
<i>A. meridianum</i>	4	#668	13	70° 57.11'S	10° 33.52'W	337.2
<i>A. falklandicum</i>	5	#515	1	70° 56.67'S	10° 32.37'W	296.4

Extracción y fraccionamiento

El organismo codificado #668 cuyo peso húmedo era de 331 g fue extraído con metanol 3 veces y después de eliminar el disolvente fue disuelto en agua:metanol y fraccionado siguiendo nuestro esquema habitual con hexano y diclorometano. El extracto de diclorometano obtenido se purificó con una columna de Sephadex LH-20, utilizándose una mezcla de metanol:diclorometano (1:1) como fase móvil. De las fracciones obtenidas se aislaron la meridianinas A-G ya descritas en la bibliografía.

Cuantificación de las meridianinas A-G

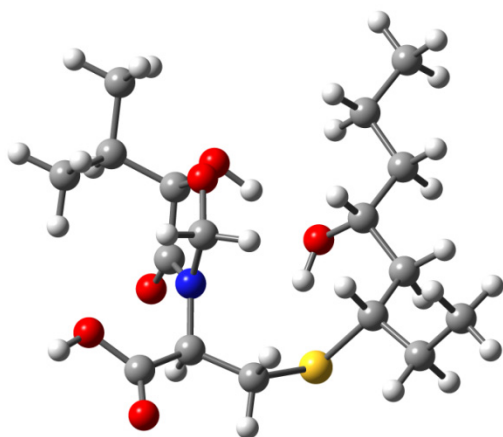
Se realizó mediante un HPLC marca Thermo Accela conectado a un espectro de masas de transformada de Fourier LTQ-Orbitrap utilizándose una columna C18 con gradiente de MeOH:H₂O con 0.1% de ácido fórmico. (Ver página 238).

Detección de las nuevas meridianinas

El grupo de investigación de CNR de Nápoles nos envió los extractos obtenidos de *Aplidium falklandicum* cuyos códigos eran #720 (EB extracto de *n*-butanol), #815 y #829 EE (ambos extractos de dietil éter). Los 3 extractos se juntaron y se sometieron a cromatografía en columna de Sephadex LH-20 utilizándose una mezcla de metanol:diclorometano (1:1) como fase móvil. cromatografió por columna de Sephadex LH-20, como fase móvil CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Se obtuvieron ocho fracciones de las cuales se estudiaron MC4, MC5, MC6, MC7, MC8.

Las nuevas meridianinas se detectaron a partir de las mezclas MC4-MC8, las cuales se sometieron a HPLC conectado a un espectro de masas de transformada de Fourier LTQ-Orbitrap, utilizándose una columna C18 con gradiente de CH₃CN:H₂O con 0.1% de ácido fórmico. Se monitarizaron los iones cuyas fórmulas se exponen en la Tabla 46.

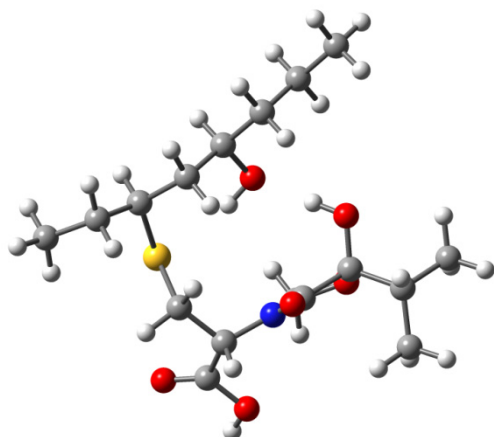
Anexo: Coordenadas XYZ de las Geometrías de los Mínimos DFT de los modelos **13a**, **13b**, **13c** y **13d**



13a1

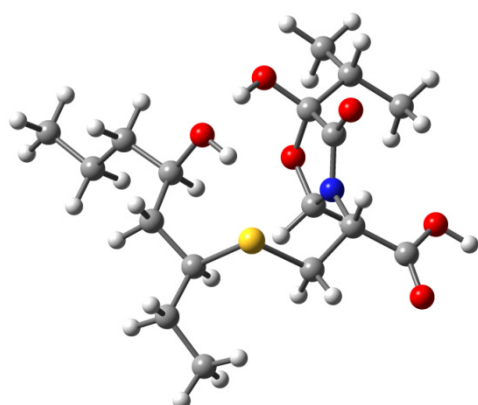
C	4.452746	3.796647	0.074104
C	3.264509	2.844844	-0.096039
C	3.689320	1.370335	-0.087553
C	2.525332	0.375947	-0.121835
C	3.028867	-1.078596	-0.135051
C	1.990564	-2.159845	0.217448
C	2.614977	-3.521723	0.576044
C	3.413711	-3.525327	1.886897
C	-0.779850	-2.762950	-0.340907
C	-1.878666	-1.697055	-0.534819
C	-3.201973	-2.229167	0.037111
C	-1.618509	0.728031	-0.866824
C	-1.222161	1.949816	-0.008293
C	-1.277206	-0.007711	1.323821
C	-2.363451	2.976841	0.128498
C	-3.629890	2.366069	0.743065
C	-1.900232	4.206765	0.921698
O	-4.078920	-1.239960	0.311621
N	-1.533443	-0.378795	-0.060117
O	-0.899720	1.348578	1.282219
O	-0.119909	2.600411	-0.522299
O	-1.914706	0.729189	-2.048633
S	0.793159	-2.359384	-1.203252
O	1.729829	0.683574	-1.281635
O	-3.457159	-3.401542	0.196724
H	-4.896866	-1.674797	0.620582
H	0.547021	1.944257	-0.838743
H	1.180447	-0.099543	-1.490118
H	5.189419	3.662317	-0.727948
H	4.127251	4.842650	0.053646
H	4.968565	3.627067	1.027881
H	2.748686	3.066380	-1.036747

H	2.529980	3.020439	0.701028
H	4.346784	1.169889	-0.945525
H	4.278405	1.166072	0.818206
H	1.906982	0.529239	0.778938
H	3.484570	-1.292182	-1.111899
H	3.836753	-1.150345	0.602891
H	1.396482	-1.803922	1.069340
H	1.809878	-4.262748	0.651371
H	3.250306	-3.849570	-0.256862
H	2.798181	-3.187649	2.730051
H	3.760319	-4.538839	2.116223
H	4.298764	-2.882104	1.840976
H	-1.154600	-3.711371	-0.727825
H	-0.565556	-2.918019	0.721014
H	-2.055903	-1.554042	-1.611112
H	-0.457404	-0.600147	1.753186
H	-2.179118	-0.152522	1.938377
H	-2.585959	3.282316	-0.902084
H	-3.453856	2.069845	1.783836
H	-4.439338	3.104396	0.741768
H	-3.981644	1.488395	0.189963
H	-1.631235	3.926470	1.946560
H	-1.030085	4.673645	0.454995
H	-2.707518	4.946595	0.972706

**13a2**

C	2.272129	5.269813	-0.271640
C	1.261950	4.302219	-0.895988
C	0.313048	3.692415	0.144912
C	-0.724441	2.736232	-0.446623
C	-1.675099	2.179675	0.626469
C	-2.917373	1.429423	0.104387
C	-4.005322	1.289173	1.185893
C	-5.346009	0.738854	0.692604
C	-2.009098	-1.232332	0.693235
C	-0.900175	-2.256224	0.396456
C	-1.374366	-3.378566	-0.524037
C	1.165324	-1.060421	0.925056
C	2.398872	-0.516197	0.171590
C	0.970476	-1.617963	-1.336726
C	3.729139	-0.916638	0.828058
C	3.843472	-2.435220	1.014545
C	4.920418	-0.354702	0.039457
O	-0.399012	-4.285446	-0.762115
N	0.372405	-1.677517	-0.003419
O	2.279945	-1.137523	-1.122592
O	2.351816	0.873557	0.088331
O	0.903887	-0.945996	2.113910
S	-2.533079	-0.198041	-0.736224
O	-0.009665	1.688438	-1.124886
O	-2.500298	-3.492835	-0.949059
H	-0.800063	-4.979085	-1.320364
H	1.520712	1.145281	-0.366789
H	-0.652533	0.974822	-1.315295
H	2.895539	4.760209	0.472659
H	2.939299	5.691555	-1.031794
H	1.769114	6.105589	0.231227

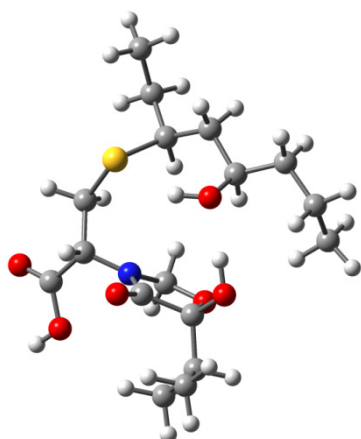
H	1.795343	3.497402	-1.413656
H	0.671377	4.825980	-1.661438
H	0.896401	3.151715	0.902822
H	-0.222592	4.496386	0.668969
H	-1.323200	3.283414	-1.195305
H	-1.100133	1.553086	1.320823
H	-2.041418	3.032582	1.214838
H	-3.342122	2.001465	-0.732552
H	-3.624606	0.673384	2.011426
H	-4.162871	2.289950	1.611782
H	-5.247641	-0.276410	0.296241
H	-6.074465	0.716752	1.510449
H	-5.759540	1.366518	-0.106063
H	-1.629754	-0.581691	1.483210
H	-2.880476	-1.772868	1.072092
H	-0.698539	-2.739056	1.365782
H	0.400546	-0.948011	-1.997780
H	1.028270	-2.611582	-1.789870
H	3.701843	-0.443298	1.817773
H	3.827762	-2.949778	0.047587
H	4.786564	-2.682745	1.514074
H	3.030298	-2.832839	1.632119
H	4.965685	-0.796513	-0.962293
H	4.844621	0.729817	-0.068235
H	5.857953	-0.589554	0.556482



13a3

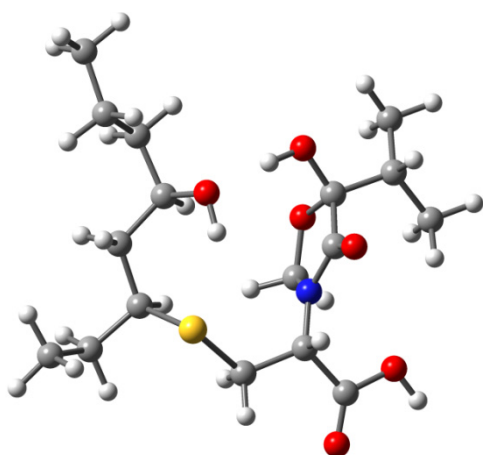
C	-4.381694	3.965041	-0.965961
C	-3.686156	2.599491	-0.989408
C	-3.005641	2.265235	0.344449
C	-2.229633	0.944314	0.357457
C	-3.137885	-0.297265	0.344314
C	-2.486703	-1.617168	-0.113989
C	-3.539171	-2.718214	-0.332359
C	-3.007410	-4.017344	-0.941581
C	0.214460	-2.709715	0.031690
C	1.525933	-1.937310	0.285710
C	2.679990	-2.656890	-0.431396
C	1.813541	0.424350	0.921467
C	1.635348	1.804232	0.249074
C	1.189674	0.069018	-1.302529
C	2.959331	2.585096	0.135020
C	4.032966	1.808801	-0.638857
C	2.725200	3.972075	-0.479802
O	3.712080	-1.831244	-0.706850
N	1.456193	-0.525480	-0.001270
O	1.117021	1.456407	-1.071114
O	0.729433	2.592626	0.927444
O	2.168497	0.208407	2.067053
S	-1.174902	-2.158937	1.106975
O	-1.413575	0.977885	1.543353
O	2.690985	-3.838391	-0.694057
H	4.407025	-2.385595	-1.111017
H	-0.037268	2.044352	1.223957
H	-1.044498	0.080473	1.674153
H	-3.666315	4.768177	-0.753321
H	-4.856785	4.186125	-1.928341
H	-5.159195	4.000744	-0.193208

H	-2.934811	2.586801	-1.791428
H	-4.424323	1.827539	-1.247609
H	-2.286512	3.058139	0.585697
H	-3.743246	2.253911	1.158991
H	-1.573862	0.922573	-0.528188
H	-3.581365	-0.414803	1.342430
H	-3.972134	-0.109828	-0.343663
H	-1.956240	-1.431923	-1.057052
H	-4.031138	-2.930949	0.625592
H	-4.314288	-2.303019	-0.992428
H	-2.275543	-4.498088	-0.284104
H	-3.824663	-4.728202	-1.103946
H	-2.528195	-3.837779	-1.912476
H	0.402618	-3.768129	0.215972
H	-0.095445	-2.618234	-1.013299
H	1.771792	-1.982533	1.357159
H	0.232886	-0.282552	-1.713821
H	1.993499	-0.174492	-2.014107
H	3.296242	2.709971	1.172225
H	3.734941	1.668069	-1.684496
H	4.974517	2.369138	-0.635897
H	4.233291	0.823959	-0.202757
H	2.360544	3.883080	-1.509608
H	1.990674	4.539516	0.095861
H	3.664439	4.536924	-0.500401

**13a4**

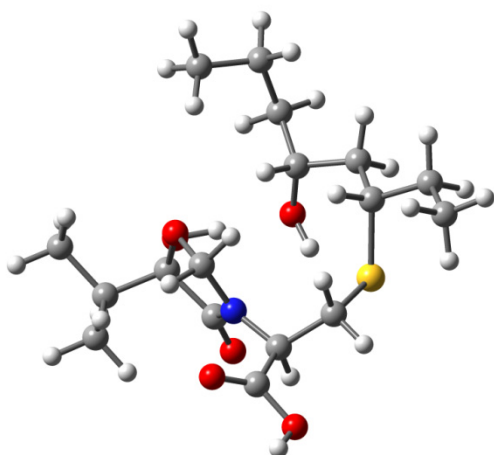
C	-0.740950	4.256727	-1.396795
C	-1.531874	4.241704	-0.082914
C	-2.611197	3.149059	-0.000277
C	-2.094655	1.707312	-0.024672
C	-3.255708	0.696183	0.006248
C	-2.892900	-0.748905	-0.386298
C	-4.111399	-1.593175	-0.807502
C	-5.210583	-1.743140	0.248452
C	-0.767650	-2.647655	0.052677
C	0.716673	-2.304530	0.296314
C	1.598119	-3.395521	-0.331873
C	1.720162	-0.113210	0.791224
C	2.024185	1.192528	0.020233
C	1.068347	-0.422043	-1.433410
C	3.525215	1.523902	-0.112893
C	4.153493	1.893651	1.239230
C	4.312068	0.410346	-0.816938
O	2.856215	-2.966612	-0.568270
N	1.099786	-0.966969	-0.085807
O	1.464586	0.922797	-1.300501
O	1.398519	2.287344	0.580611
O	1.943826	-0.348190	1.966577
S	-1.925911	-1.566994	0.988451
O	-1.217554	1.547586	1.105947
O	1.230080	-4.525496	-0.561692
H	3.347436	-3.734603	-0.918170
H	0.463196	2.061578	0.804195
H	-1.132332	0.590179	1.291076
H	-1.411315	4.318721	-2.264410
H	-0.072855	5.124518	-1.431933
H	-0.114113	3.366428	-1.506402
H	-2.031077	5.210761	0.049636

H	-0.840257	4.138010	0.761062
H	-3.193403	3.279995	0.921869
H	-3.309993	3.271690	-0.840254
H	-1.516997	1.544576	-0.948928
H	-3.729508	0.729172	0.995709
H	-4.014370	1.037431	-0.711275
H	-2.202552	-0.701453	-1.237502
H	-4.532634	-1.128827	-1.711615
H	-3.759040	-2.587472	-1.110936
H	-5.659004	-0.778345	0.509894
H	-6.012437	-2.387699	-0.127212
H	-4.818273	-2.195027	1.165612
H	-0.929919	-3.682941	0.354890
H	-1.016069	-2.585455	-1.011441
H	0.922228	-2.340896	1.376432
H	0.056856	-0.464180	-1.861080
H	1.755139	-0.974401	-2.093375
H	3.536358	2.414736	-0.755922
H	4.148641	1.040809	1.925170
H	5.192696	2.210440	1.091191
H	3.604717	2.711046	1.712402
H	4.305162	-0.520959	-0.237656
H	3.908432	0.200751	-1.812829
H	5.357909	0.713273	-0.938977

**13a6**

C	-5.040901	3.529856	0.325837
C	-4.259653	2.224560	0.509848
C	-3.130322	2.069632	-0.517128
C	-2.234141	0.840373	-0.326130
C	-2.993554	-0.496179	-0.411857
C	-2.113475	-1.735070	-0.666432
C	-2.904713	-2.953043	-1.181235
C	-4.023616	-3.452179	-0.262508
C	0.466153	-2.739882	0.158696
C	1.668563	-1.842382	0.519408
C	2.968094	-2.551600	0.105750
C	1.720575	0.591878	0.884217
C	1.610748	1.867246	0.019410
C	1.539589	-0.064826	-1.350709
C	2.895156	2.718904	0.044965
C	4.128628	1.936540	-0.424798
C	2.711957	4.006776	-0.770517
O	3.998792	-1.692440	-0.042731
N	1.575895	-0.483167	0.043345
O	1.365418	1.332042	-1.316853
O	0.559042	2.666559	0.417417
O	1.869086	0.537801	2.092391
S	-1.126611	-2.153448	0.866653
O	-1.573430	1.003267	0.943164
O	3.079297	-3.748151	-0.039259
H	4.781940	-2.235781	-0.254967
H	-0.213144	2.106707	0.674391
H	-1.186317	0.141537	1.199782
H	-5.500046	3.584897	-0.669377
H	-5.842688	3.621573	1.067273
H	-4.384581	4.401650	0.435273

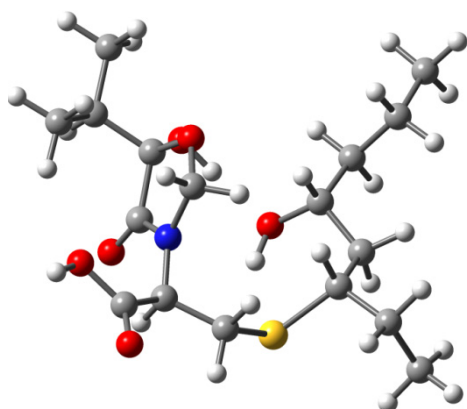
H	-4.954016	1.376360	0.435282
H	-3.829117	2.187588	1.516986
H	-3.546051	2.037351	-1.534338
H	-2.479541	2.953338	-0.477811
H	-1.472828	0.858065	-1.123065
H	-3.601315	-0.629161	0.490916
H	-3.697922	-0.429066	-1.253032
H	-1.369204	-1.466538	-1.425786
H	-3.328641	-2.676754	-2.158149
H	-2.198748	-3.770962	-1.374479
H	-4.799435	-2.692651	-0.116424
H	-4.505012	-4.335631	-0.695332
H	-3.632501	-3.731690	0.721484
H	0.666128	-3.741980	0.539950
H	0.354269	-2.831237	-0.926113
H	1.723398	-1.737800	1.613177
H	0.696207	-0.523803	-1.885471
H	2.474805	-0.337860	-1.863455
H	3.029701	2.984425	1.101494
H	4.036918	1.661630	-1.482114
H	5.025751	2.556911	-0.321174
H	4.290354	1.021956	0.155977
H	2.536769	3.773647	-1.826999
H	1.864289	4.589550	-0.403361
H	3.614925	4.624794	-0.704359



13a11

C	-0.055047	4.167791	1.820635
C	1.117829	4.373530	0.852095
C	0.917878	3.696136	-0.515419
C	1.112765	2.174307	-0.508411
C	2.599636	1.777016	-0.514744
C	2.940203	0.367381	0.006895
C	4.457435	0.186086	0.185960
C	4.888818	-1.128089	0.840365
C	1.561484	-2.206584	0.021966
C	0.043499	-2.464529	-0.164576
C	-0.367141	-3.693045	0.652683
C	-1.579296	-0.741930	-0.820199
C	-2.302145	0.447998	-0.138483
C	-0.942291	-0.658110	1.422876
C	-3.785210	0.150482	0.177509
C	-4.383141	1.270823	1.042138
C	-4.608202	-0.068600	-1.100949
O	0.206403	-4.813158	0.157020
N	-0.788983	-1.327487	0.133272
O	-1.544202	0.576766	1.108883
O	-2.214553	1.612089	-0.860740
O	-1.664855	-1.088106	-1.987514
S	2.220021	-0.930917	-1.131406
O	0.429541	1.679170	-1.677347
O	-1.086243	-3.692073	1.625243
H	-0.084820	-5.551236	0.725970
H	-1.314476	1.680125	-1.263146
H	0.664804	0.736060	-1.784059
H	-0.275913	3.108167	1.989290
H	0.153181	4.628429	2.793353
H	-0.969036	4.624118	1.422882

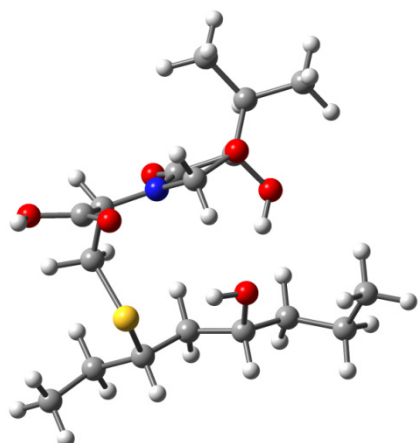
H	2.049804	4.019539	1.316452
H	1.260870	5.449582	0.690556
H	-0.101682	3.895439	-0.867219
H	1.595274	4.130485	-1.262941
H	0.628251	1.754317	0.384378
H	2.991539	1.915572	-1.531690
H	3.147950	2.482552	0.123580
H	2.441692	0.226293	0.974979
H	4.943362	0.289060	-0.792938
H	4.815739	1.026061	0.798358
H	4.614519	-1.991140	0.224643
H	5.975449	-1.150758	0.975978
H	4.430466	-1.253527	1.829761
H	2.098089	-3.141012	-0.156021
H	1.775276	-1.892323	1.047730
H	-0.145969	-2.691492	-1.220499
H	0.029484	-0.470824	1.897250
H	-1.561903	-1.259026	2.099913
H	-3.795320	-0.780915	0.763889
H	-4.388067	2.217293	0.492672
H	-5.416622	1.025175	1.311990
H	-3.809112	1.412434	1.962173
H	-4.624008	0.844587	-1.703768
H	-4.196627	-0.869971	-1.720632
H	-5.640836	-0.327447	-0.839707



13a9

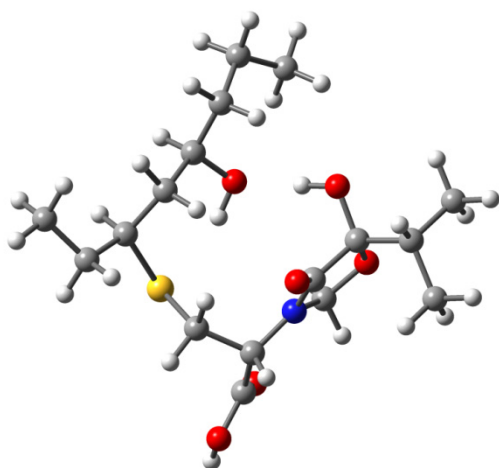
C	-4.625274	3.806865	-0.792207
C	-3.825661	2.507020	-0.933424
C	-3.127281	2.103149	0.371655
C	-2.241894	0.857171	0.270694
C	-3.040860	-0.447386	0.112086
C	-2.239615	-1.661064	-0.397625
C	-3.130085	-2.797812	-0.935624
C	-4.133352	-3.381489	0.063854
C	0.405184	-2.773786	-0.059475
C	1.665948	-1.936474	0.246228
C	2.878174	-2.585708	-0.440321
C	1.819925	0.423793	0.929554
C	1.609350	1.807161	0.273224
C	1.314655	0.084413	-1.325242
C	2.901783	2.645684	0.221754
C	4.035188	1.934771	-0.529404
C	2.628795	4.034734	-0.372339
O	3.887060	-1.711341	-0.642271
N	1.536497	-0.524449	-0.021345
O	1.154163	1.460229	-1.071017
O	0.646485	2.544817	0.929122
O	2.139854	0.203433	2.084367
S	-1.066909	-2.275588	0.924219
O	-1.445841	0.841089	1.471267
O	2.948542	-3.756150	-0.740615
H	4.620711	-2.223553	-1.033414
H	-0.100364	1.958732	1.203237
H	-1.045069	-0.048090	1.558028
H	-3.975198	4.640025	-0.500125
H	-5.113496	4.077933	-1.735020
H	-5.405411	3.711466	-0.027166

H	-3.072637	2.626543	-1.724959
H	-4.500901	1.708161	-1.269882
H	-2.480193	2.926652	0.699511
H	-3.866294	1.951388	1.170838
H	-1.572856	0.977473	-0.597379
H	-3.534914	-0.672244	1.066017
H	-3.842075	-0.274921	-0.618362
H	-1.596219	-1.316394	-1.216204
H	-3.670751	-2.403301	-1.808761
H	-2.482971	-3.599697	-1.313282
H	-4.858565	-2.631204	0.397195
H	-4.695101	-4.201340	-0.396377
H	-3.624705	-3.778794	0.948651
H	0.631969	-3.817578	0.161043
H	0.148570	-2.724140	-1.122245
H	1.875705	-1.985284	1.325093
H	0.403766	-0.305438	-1.799947
H	2.170121	-0.102091	-1.992442
H	3.196869	2.762006	1.272606
H	3.782426	1.809011	-1.588781
H	4.950969	2.534043	-0.477386
H	4.261794	0.948547	-0.109820
H	2.304610	3.952944	-1.416202
H	1.850545	4.557323	0.188106
H	3.542734	4.639509	-0.347809

**13a8**

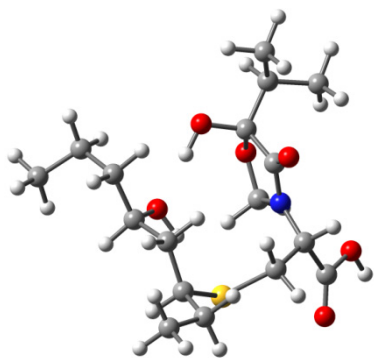
C	-1.992586	3.975776	1.622561
C	-1.010001	4.652875	0.658050
C	-0.290300	3.725579	-0.338834
C	0.723687	2.746062	0.264163
C	1.623014	2.116260	-0.817079
C	2.876868	1.376356	-0.307678
C	3.899022	1.127099	-1.431792
C	5.252140	0.577667	-0.972820
C	1.914152	-1.316990	-0.633858
C	0.799464	-2.292716	-0.170952
C	1.303535	-3.152712	0.980139
C	-1.141738	-1.009011	-0.899625
C	-2.447346	-0.449605	-0.299762
C	-1.250257	-1.626146	1.354520
C	-3.693821	-0.813792	-1.122020
C	-3.818460	-2.328572	-1.332527
C	-4.962002	-0.230039	-0.483456
O	2.209787	-4.046134	0.525429
N	-0.464670	-1.630260	0.112113
O	-2.502438	-1.085515	0.986124
O	-2.383996	0.939822	-0.197284
O	-0.75479	-0.898577	-2.057000
S	2.494419	-0.165595	0.678810
O	-0.004103	1.745267	0.998536
O	1.001025	-3.054211	2.147272
H	2.548038	-4.520355	1.308867
H	-1.566710	1.198132	0.288833
H	0.626286	1.032710	1.229949
H	-1.478116	3.309698	2.320163
H	-2.535654	4.729403	2.205254
H	-2.728487	3.372793	1.078715

H	-0.255554	5.210990	1.232338
H	-1.553477	5.404484	0.069459
H	-1.024398	3.149749	-0.917792
H	0.251050	4.355485	-1.057563
H	1.366453	3.296497	0.973289
H	1.012737	1.465040	-1.456395
H	1.982621	2.930332	-1.461437
H	3.358489	1.998759	0.459616
H	3.458886	0.463806	-2.187656
H	4.055560	2.089704	-1.938007
H	5.152823	-0.406115	-0.503508
H	5.934418	0.480838	-1.824316
H	5.722554	1.246145	-0.241651
H	1.504524	-0.749845	-1.470136
H	2.758333	-1.913002	-0.990409
H	0.641416	-2.956347	-1.031630
H	-0.763373	-1.020617	2.128421
H	-1.401163	-2.637039	1.740433
H	-3.533109	-0.337118	-2.097201
H	-3.934282	-2.847208	-0.374536
H	-4.697929	-2.552480	-1.946281
H	-2.944375	-2.741308	-1.849153
H	-5.142230	-0.677454	0.500442
H	-4.877231	0.851733	-0.356511
H	-5.832215	-0.439834	-1.116149

**13a5**

C	-5.034097	3.304722	-0.583504
C	-4.138144	2.068458	-0.717482
C	-3.308114	1.808319	0.546407
C	-2.309750	0.650832	0.441843
C	-2.981054	-0.733144	0.408797
C	-2.096927	-1.897481	-0.077021
C	-2.888814	-3.168776	-0.436840
C	-3.798648	-3.021191	-1.664122
C	0.652578	-2.753097	0.195139
C	1.850379	-1.795468	0.370637
C	3.077292	-2.391074	-0.337638
C	1.822105	0.612445	0.883073
C	1.462006	1.921218	0.144543
C	1.246203	0.067387	-1.314334
C	2.671867	2.860996	-0.031119
C	3.830696	2.195730	-0.785449
C	2.249249	4.171747	-0.708930
O	3.999288	-1.454778	-0.647773
N	1.585904	-0.422707	0.013588
O	0.979566	1.439904	-1.147298
O	0.468767	2.622058	0.795874
O	2.208516	0.504190	2.033532
S	-0.806791	-2.296303	1.216464
O	-1.433155	0.789398	1.576348
O	3.229419	-3.569645	-0.567756
H	4.752949	-1.931855	-1.045260
H	-0.211073	1.998161	1.149631
H	-0.945628	-0.052198	1.690165
H	-4.437339	4.205108	-0.395615
H	-5.617641	3.474082	-1.495361
H	-5.739512	3.195497	0.249258

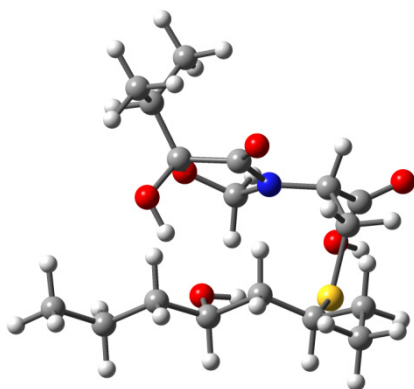
H	-3.462347	2.199557	-1.574285
H	-4.765351	1.197100	-0.951572
H	-2.725051	2.708153	0.780515
H	-3.966976	1.633211	1.408368
H	-1.720530	0.783468	-0.480890
H	-3.392765	-0.953377	1.403600
H	-3.836847	-0.673836	-0.272979
H	-1.542657	-1.560614	-0.962647
H	-2.173328	-3.979084	-0.622662
H	-3.476854	-3.479275	0.436458
H	-3.231977	-2.692099	-2.544116
H	-4.260887	-3.983317	-1.910285
H	-4.609906	-2.303549	-1.502168
H	0.976089	-3.754969	0.480134
H	0.342523	-2.807786	-0.853022
H	2.117301	-1.746546	1.436738
H	0.350026	-0.431486	-1.708908
H	2.080139	-0.095622	-2.014248
H	3.001183	3.081110	0.992610
H	3.549558	1.980281	-1.823103
H	4.694417	2.869331	-0.811124
H	4.154403	1.260908	-0.315183
H	1.879228	3.979731	-1.722486
H	1.458726	4.671025	-0.144428
H	3.107284	4.849926	-0.783068



13a13

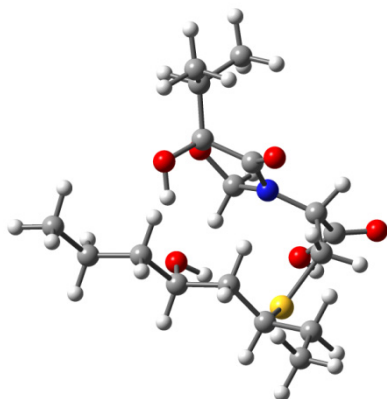
C	0.562010	4.326528	-1.703041
C	-0.636287	4.629934	-0.794246
C	-1.034669	3.519169	0.195444
C	-1.619404	2.243589	-0.422763
C	-2.297615	1.353050	0.637164
C	-3.184197	0.216134	0.093412
C	-4.129766	-0.392821	1.147898
C	-5.226108	0.566908	1.631311
C	-1.362212	-1.957140	0.585319
C	0.039692	-2.506981	0.212107
C	-0.080940	-3.534092	-0.905153
C	1.395951	-0.617184	0.940805
C	2.436928	0.354246	0.348807
C	1.768778	-1.195987	-1.295503
C	3.712462	0.466400	1.199321
C	4.349199	-0.904891	1.459674
C	4.714129	1.437672	0.558756
O	-0.641365	-4.668304	-0.429962
N	1.014031	-1.462248	-0.063024
O	2.742798	-0.243885	-0.919905
O	1.893858	1.631691	0.211311
O	0.959194	-0.624291	2.085535
S	-2.231242	-1.118384	-0.804135
O	-0.557101	1.549844	-1.102081
O	0.221094	-3.382986	-2.066809
H	-0.758533	-5.261406	-1.196495
H	1.059771	1.582778	-0.311097
H	-0.885199	0.657565	-1.335682
H	0.342577	3.514239	-2.400777
H	0.834240	5.214911	-2.285333
H	1.436758	4.024589	-1.115961

H	-1.510520	4.886889	-1.410832
H	-0.413403	5.528522	-0.203045
H	-0.173451	3.238764	0.816216
H	-1.791933	3.929204	0.877350
H	-2.378868	2.531012	-1.170724
H	-1.532280	0.961028	1.319856
H	-2.943986	2.002794	1.240102
H	-3.800117	0.615341	-0.724609
H	-4.603034	-1.280458	0.711749
H	-3.543024	-0.740993	2.007844
H	-5.822319	0.942558	0.790822
H	-5.906905	0.048629	2.315348
H	-4.820592	1.430660	2.168579
H	-1.213077	-1.254048	1.405361
H	-1.971753	-2.791340	0.941505
H	0.373403	-3.039165	1.112675
H	1.112510	-0.810158	-2.085450
H	2.273647	-2.092122	-1.662645
H	3.373515	0.88283	2.156278
H	4.652417	-1.378011	0.519251
H	5.241760	-0.793347	2.085061
H	3.662959	-1.579473	1.984245
H	5.064411	1.053734	-0.405912
H	4.261031	2.41769	0.392043
H	5.586129	1.562904	1.211034

**13a17**

C	-3.372938	3.910304	-1.793697
C	-2.304520	3.811305	-0.699328
C	-2.506734	2.648084	0.286965
C	-2.480097	1.253177	-0.344410
C	-2.638074	0.145472	0.710626
C	-2.883394	-1.274190	0.163304
C	-3.427170	-2.258602	1.218158
C	-4.852203	-1.941067	1.692800
C	-0.240966	-2.310352	0.641865
C	1.246434	-2.147021	0.283053
C	1.742381	-3.244722	-0.655557
C	1.726505	0.194157	0.79144
C	2.071692	1.489606	0.020011
C	1.887600	-0.315055	-1.485742
C	3.305377	2.244865	0.546547
C	3.022464	2.947149	1.883023
C	4.539435	1.336850	0.634700
O	3.046938	-3.087751	-0.977846
N	1.629564	-0.808217	-0.134526
O	2.372776	0.996189	-1.302403
O	0.993010	2.368156	0.004493
O	1.530644	0.057844	1.991745
S	-1.420248	-2.010185	-0.740437
O	-1.245866	1.132728	-1.072429
O	1.079140	-4.184961	-1.026418
H	3.283525	-3.850521	-1.539840
H	0.207752	1.917104	-0.385120
H	-1.125763	0.184837	-1.287339
H	-4.381889	3.975006	-1.365722
H	-3.217051	4.803049	-2.409694
H	-3.347548	3.043978	-2.464441

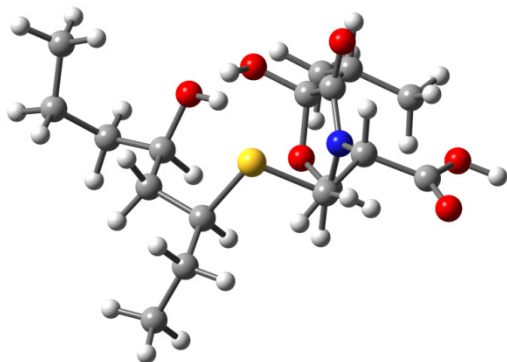
H	-2.293902	4.743014	-0.118875
H	-1.313197	3.726859	-1.157859
H	-1.725004	2.692308	1.056943
H	-3.470606	2.766579	0.801851
H	-3.311468	1.165425	-1.062830
H	-1.766450	0.160633	1.378147
H	-3.503044	0.412045	1.331434
H	-3.618777	-1.211456	-0.651188
H	-3.413501	-3.265608	0.785455
H	-2.750301	-2.280226	2.082369
H	-5.552468	-1.909445	0.849226
H	-5.201533	-2.715386	2.384507
H	-4.916093	-0.982531	2.218680
H	-0.447723	-1.602324	1.446447
H	-0.392280	-3.325286	1.017241
H	1.782201	-2.310190	1.231553
H	0.970260	-0.323694	-2.093221
H	2.656939	-0.911706	-1.984507
H	3.491500	3.011510	-0.218228
H	2.789364	2.218933	2.665782
H	3.903645	3.520249	2.194997
H	2.177169	3.633245	1.792795
H	4.411408	0.565725	1.404542
H	4.742568	0.84378	-0.320700
H	5.421408	1.927142	0.906583



13a15

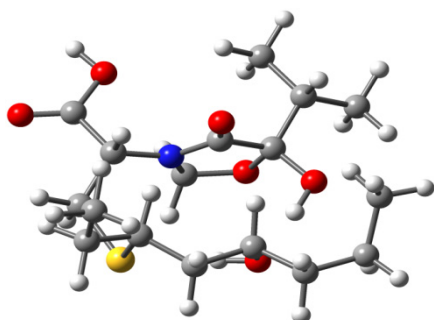
C	-3.372938	3.910304	-1.793697
C	-2.304520	3.811305	-0.699328
C	-2.506734	2.648084	0.286965
C	-2.480097	1.253177	-0.344410
C	-2.638074	0.145472	0.710626
C	-2.883394	-1.274190	0.163304
C	-3.427170	-2.258602	1.218158
C	-4.852203	-1.941067	1.692800
C	-0.240966	-2.310352	0.641865
C	1.246434	-2.147021	0.283053
C	1.742381	-3.244722	-0.655557
C	1.726505	0.194157	0.791440
C	2.071692	1.489606	0.020011
C	1.887600	-0.315055	-1.485742
C	3.305377	2.244865	0.546547
C	3.022464	2.947149	1.883023
C	4.539435	1.336850	0.634700
O	3.046938	-3.087751	-0.977846
N	1.629564	-0.808217	-0.134526
O	2.372776	0.996189	-1.302403
O	0.993010	2.368156	0.004493
O	1.530644	0.057844	1.991745
S	-1.420248	-2.010185	-0.740437
O	-1.245866	1.132728	-1.072429
O	1.079140	-4.184961	-1.026418
H	3.283525	-3.850521	-1.539840
H	0.207752	1.917104	-0.385120
H	-1.125763	0.184837	-1.287339
H	-4.381889	3.975006	-1.365722
H	-3.217051	4.803049	-2.409694
H	-3.347548	3.043978	-2.464441

H	-2.293902	4.743014	-0.118875
H	-1.313197	3.726859	-1.157859
H	-1.725004	2.692308	1.056943
H	-3.470606	2.766579	0.801851
H	-3.311468	1.165425	-1.062830
H	-1.766450	0.160633	1.378147
H	-3.503044	0.412045	1.331434
H	-3.618777	-1.211456	-0.651188
H	-3.413501	-3.265608	0.785455
H	-2.750301	-2.280226	2.082369
H	-5.552468	-1.909445	0.849226
H	-5.201533	-2.715386	2.384507
H	-4.916093	-0.982531	2.218680
H	-0.447723	-1.602324	1.446447
H	-0.392280	-3.325286	1.017241
H	1.782201	-2.31019	1.231553
H	0.970260	-0.323694	-2.093221
H	2.656939	-0.911706	-1.984507
H	3.491500	3.011510	-0.218228
H	2.789364	2.218933	2.665782
H	3.903645	3.520249	2.194997
H	2.177169	3.633245	1.792795
H	4.411408	0.565725	1.404542
H	4.742568	0.843780	-0.320700
H	5.421408	1.927142	0.906583

**13a14**

C	-3.372938	3.910304	-1.793697
C	-2.304520	3.811305	-0.699328
C	-2.506734	2.648084	0.286965
C	-2.480097	1.253177	-0.344410
C	-2.638074	0.145472	0.710626
C	-2.883394	-1.274190	0.163304
C	-3.427170	-2.258602	1.218158
C	-4.852203	-1.941067	1.692800
C	-0.240966	-2.310352	0.641865
C	1.246434	-2.147021	0.283053
C	1.742381	-3.244722	-0.655557
C	1.726505	0.194157	0.791440
C	2.071692	1.489606	0.020011
C	1.887600	-0.315055	-1.485742
C	3.305377	2.244865	0.546547
C	3.022464	2.947149	1.883023
C	4.539435	1.336850	0.634700
O	3.046938	-3.087751	-0.977846
N	1.629564	-0.808217	-0.134526
O	2.372776	0.996189	-1.302403
O	0.993010	2.368156	0.004493
O	1.530644	0.057844	1.991745
S	-1.420248	-2.010185	-0.740437
O	-1.245866	1.132728	-1.072429
O	1.079140	-4.184961	-1.026418
H	3.283525	-3.850521	-1.539840
H	0.207752	1.917104	-0.385120
H	-1.125763	0.184837	-1.287339
H	-4.381889	3.975006	-1.365722
H	-3.217051	4.803049	-2.409694
H	-3.347548	3.043978	-2.464441

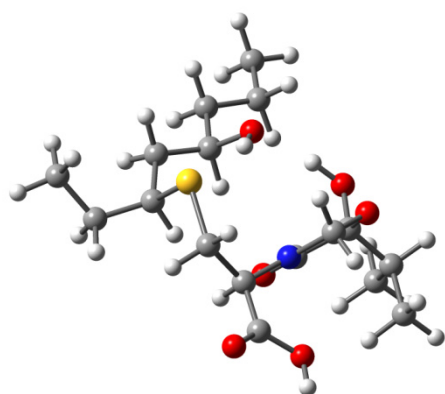
H	-2.293902	4.743014	-0.118875
H	-1.313197	3.726859	-1.157859
H	-1.725004	2.692308	1.056943
H	-3.470606	2.766579	0.801851
H	-3.311468	1.165425	-1.06283
H	-1.766450	0.160633	1.378147
H	-3.503044	0.412045	1.331434
H	-3.618777	-1.211456	-0.651188
H	-3.413501	-3.265608	0.785455
H	-2.750301	-2.280226	2.082369
H	-5.552468	-1.909445	0.849226
H	-5.201533	-2.715386	2.384507
H	-4.916093	-0.982531	2.218680
H	-0.447723	-1.602324	1.446447
H	-0.392280	-3.325286	1.017241
H	1.782201	-2.310190	1.231553
H	0.970260	-0.323694	-2.093221
H	2.656939	-0.911706	-1.984507
H	3.491500	3.011510	-0.218228
H	2.789364	2.218933	2.665782
H	3.903645	3.520249	2.194997
H	2.177169	3.633245	1.792795
H	4.411408	0.565725	1.404542
H	4.742568	0.843780	-0.320700
H	5.421408	1.927142	0.906583



13b13

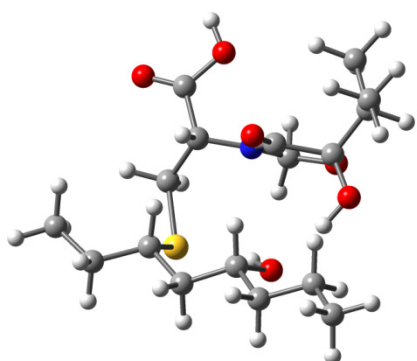
C	2.136094	4.082478	-0.087487
C	3.018631	2.824852	-0.160583
C	2.256692	1.496846	-0.146862
C	3.217857	0.296028	-0.197549
C	2.582407	-1.086596	0.065643
S	1.682651	-1.605081	-1.484759
C	0.402702	-2.76743	-0.887655
C	-0.632194	-2.198494	0.109018
C	-1.657253	-3.294341	0.437398
O	-2.821198	-2.791332	0.900326
O	-1.442109	-4.480602	0.333074
N	-1.233674	-0.943795	-0.271282
C	-2.061340	-0.715162	-1.447453
O	-2.408653	0.649210	-1.403189
C	-1.939956	1.292713	-0.188729
C	-1.140070	0.172389	0.510404
O	-0.512133	0.260381	1.556981
C	-3.130135	1.784771	0.659936
C	-3.865835	2.931381	-0.047591
C	-4.094228	0.648013	1.023604
O	-1.148156	2.385720	-0.485219
C	3.601006	-2.161979	0.485035
C	4.161933	-1.965620	1.900279
O	1.348156	1.511062	-1.271916
C	1.334455	4.220560	1.212797
H	-3.384456	-3.558175	1.120541
H	-0.278778	2.095411	-0.855828
H	1.180690	0.583915	-1.537027
H	1.452725	4.092550	-0.944729
H	2.789447	4.957296	-0.205821
H	3.626785	2.859637	-1.074981
H	3.716669	2.824283	0.689126

H	1.664315	1.420123	0.775160
H	3.755998	0.292252	-1.156492
H	3.975280	0.459848	0.578298
H	1.825773	-0.968825	0.850291
H	0.867633	-3.646695	-0.436667
H	-0.092240	-3.114951	-1.800317
H	-0.135166	-1.974870	1.063171
H	-2.961856	-1.345791	-1.414527
H	-1.503213	-0.931524	-2.369908
H	-2.675941	2.169620	1.582237
H	-4.300626	2.586562	-0.992541
H	-4.680188	3.301865	0.585900
H	-3.188810	3.760315	-0.265048
H	-4.573039	0.241824	0.125169
H	-3.594367	-0.174894	1.546212
H	-4.885530	1.025308	1.680795
H	3.119376	-3.146502	0.433117
H	4.417078	-2.184614	-0.248686
H	3.359266	-1.950189	2.647393
H	4.841092	-2.785660	2.158022
H	4.726177	-1.032017	1.999213
H	0.572698	3.440300	1.305593
H	0.814685	5.184972	1.24368

**13b5**

C	3.959074	-2.159532	0.042417
C	3.967380	-0.634459	-0.129620
C	2.575912	0.001041	-0.120327
C	2.648696	1.527877	-0.297774
C	1.298356	2.240872	-0.534270
S	0.413464	2.376995	1.106398
C	-1.355246	2.511083	0.656220
C	-1.954851	1.341825	-0.156755
C	-3.459026	1.587980	-0.344106
O	-4.131338	0.457687	-0.648155
O	-3.986957	2.674255	-0.267668
N	-1.650321	0.020212	0.335151
C	-2.049570	-0.527100	1.623605
O	-1.514577	-1.828642	1.658394
C	-0.891009	-2.202161	0.398690
C	-0.983873	-0.897577	-0.425887
O	-0.528397	-0.69009	-1.543708
C	-1.658516	-3.392842	-0.216312
C	-3.149413	-3.087961	-0.412981
C	-1.005973	-3.89261	-1.513713
O	0.412217	-2.605686	0.608004
C	1.438799	3.607039	-1.230929
C	2.344760	4.623984	-0.530239
O	1.940754	-0.368207	1.124182
C	5.360764	-2.769376	-0.059128
H	-5.061183	0.720448	-0.789581
H	0.964391	-1.838046	0.895426
H	1.278597	0.318778	1.343547
H	3.302845	-2.608697	-0.715365
H	3.519020	-2.409518	1.014315
H	4.570106	-0.176453	0.667739

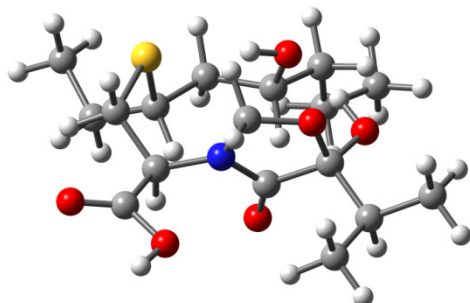
H	4.451881	-0.377681	-1.082889
H	1.984070	-0.418796	-0.947111
H	3.181340	1.967418	0.556278
H	3.270368	1.722062	-1.182164
H	0.685926	1.587379	-1.164745
H	-1.539654	3.438954	0.110733
H	-1.867557	2.613576	1.618269
H	-1.531999	1.349036	-1.171028
H	-3.146180	-0.553601	1.708705
H	-1.639136	0.070770	2.450242
H	-1.563782	-4.179130	0.545012
H	-3.307774	-2.284857	-1.143030
H	-3.666223	-3.978639	-0.787317
H	-3.626112	-2.795867	0.528040
H	-1.056629	-3.133464	-2.300717
H	0.044870	-4.141716	-1.349444
H	-1.525713	-4.790359	-1.868691
H	1.819730	3.412859	-2.244263
H	0.438836	4.040093	-1.364729
H	3.377506	4.265440	-0.459084
H	2.361039	5.566807	-1.087558
H	1.991247	4.838616	0.483698
H	5.814669	-2.569057	-1.037919
H	5.330884	-3.856202	0.077479
H	6.030233	-2.356591	0.705974



13b2

C	-4.290939	-0.741793	-0.224087
C	-3.401308	-1.992089	-0.236291
C	-1.906351	-1.701424	-0.082554
C	-1.079014	-2.998596	-0.093903
C	0.446844	-2.859078	-0.292209
S	1.193827	-2.143897	1.266033
C	2.564439	-1.066355	0.700128
C	2.184646	0.140141	-0.184592
C	3.473566	0.884643	-0.569499
O	3.287977	2.212822	-0.716100
O	4.537410	0.338145	-0.756215
N	1.152979	0.992788	0.349497
C	1.181808	1.670107	1.637125
O	-0.030574	2.380941	1.711898
C	-0.805246	2.281369	0.485071
C	0.052337	1.335577	-0.385072
O	-0.201757	0.921647	-1.508479
C	-0.994845	3.695545	-0.103723
C	0.342312	4.401569	-0.364112
C	-1.884194	3.686080	-1.355784
O	-2.057416	1.757859	0.744010
C	1.076222	-4.213046	-0.666900
C	2.579102	-4.197119	-0.955929
O	-1.735349	-0.969778	1.151075
C	-5.762940	-1.068414	-0.495876
H	4.146894	2.580152	-1.000956
H	-1.981842	0.800849	0.974750
H	-0.800474	-1.065904	1.423623
H	-3.924740	-0.025658	-0.971711
H	-4.200280	-0.241529	0.746295
H	-3.713093	-2.676017	0.566300

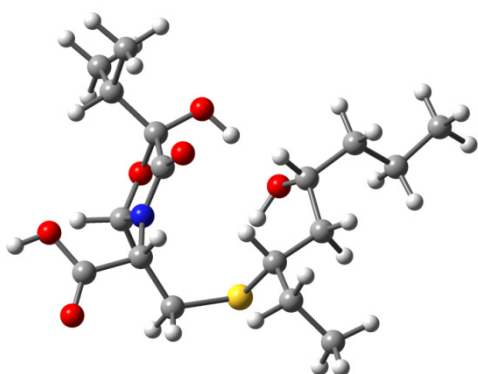
H	-3.544236	-2.529428	-1.184981
H	-1.579519	-1.064259	-0.917322
H	-1.289783	-3.567786	0.822502
H	-1.446023	-3.612437	-0.927122
H	0.630427	-2.132482	-1.092783
H	3.318870	-1.649842	0.172462
H	3.026712	-0.724912	1.632790
H	1.770197	-0.217024	-1.137534
H	2.039052	2.357408	1.694251
H	1.246266	0.945931	2.462454
H	-1.522521	4.237721	0.692961
H	0.925806	3.891188	-1.140157
H	0.162678	5.426074	-0.708622
H	0.950430	4.455048	0.544296
H	-1.412065	3.130428	-2.172147
H	-2.850169	3.222161	-1.143343
H	-2.059077	4.713889	-1.695570
H	0.862827	-4.933924	0.133253
H	0.545336	-4.575357	-1.558962
H	3.158651	-3.950369	-0.060414
H	2.911566	-5.182775	-1.299138
H	2.831294	-3.472883	-1.740604
H	-5.893912	-1.536791	-1.479677
H	-6.380043	-0.163192	-0.473703
H	-6.162275	-1.761229	0.255531



13b10

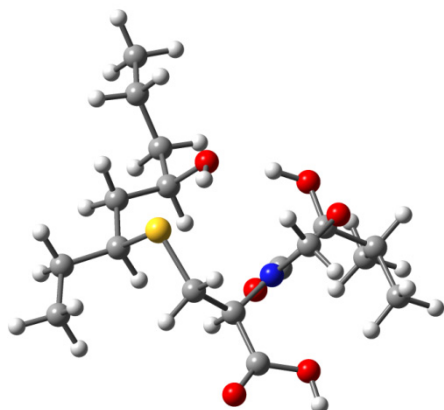
C	4.314825	-2.105176	-0.955354
C	3.496488	-1.863631	0.320323
C	2.391176	-0.811498	0.190766
C	2.932136	0.623549	0.072117
C	1.882534	1.700965	-0.282105
S	0.903540	2.100739	1.258133
C	-0.690103	2.735172	0.621565
C	-1.501149	1.786381	-0.289040
C	-2.839432	2.457124	-0.633705
O	-3.769284	1.569286	-1.045021
O	-3.037809	3.649798	-0.582517
N	-1.646890	0.433414	0.190875
C	-2.341332	0.025664	1.404220
O	-2.244684	-1.379455	1.438988
C	-1.590373	-1.913346	0.257181
C	-1.208876	-0.641112	-0.530261
O	-0.603009	-0.586656	-1.592158
C	-2.553078	-2.824266	-0.531552
C	-2.880288	-4.092114	0.269610
C	-3.831733	-2.090084	-0.955763
O	-0.482989	-2.664067	0.600328
C	2.486172	2.962797	-0.926378
C	3.567043	3.678128	-0.109960
O	1.551759	-0.970136	1.357380
C	5.330663	-3.241242	-0.792131
H	-4.561809	2.089276	-1.280003
H	0.219508	-2.085797	0.986464
H	1.101718	-0.117891	1.529394
H	4.847927	-1.189944	-1.247545
H	3.632659	-2.340644	-1.784039
H	3.008580	-2.801945	0.614581

H	4.158365	-1.586349	1.152915
H	1.788550	-1.033149	-0.702191
H	3.470804	0.884040	0.993367
H	3.676052	0.632573	-0.734438
H	1.176747	1.251766	-0.988942
H	-0.539155	3.676079	0.088489
H	-1.259065	2.981398	1.523892
H	-0.981205	1.670001	-1.250201
H	-3.394937	0.339410	1.370429
H	-1.864667	0.459429	2.295384
H	-1.994037	-3.107417	-1.432773
H	-3.417000	-3.838808	1.190864
H	-3.518694	-4.756926	-0.323777
H	-1.970905	-4.632528	0.541206
H	-4.412907	-1.783128	-0.078602
H	-3.623028	-1.198172	-1.556698
H	-4.462286	-2.753940	-1.557555
H	2.900597	2.660340	-1.899250
H	1.675014	3.667312	-1.153363
H	4.441868	3.039171	0.053891
H	3.909231	4.575934	-0.635903
H	3.185838	3.986543	0.869200
H	6.044556	-3.022344	0.011340
H	5.902790	-3.399430	-1.713253
H	4.830579	-4.184591	-0.542350

**13b19**

C	4.314825	-2.105176	-0.955354
C	3.496488	-1.863631	0.320323
C	2.391176	-0.811498	0.190766
C	2.932136	0.623549	0.072117
C	1.882534	1.700965	-0.282105
S	0.903540	2.100739	1.258133
C	-0.690103	2.735172	0.621565
C	-1.501149	1.786381	-0.289040
C	-2.839432	2.457124	-0.633705
O	-3.769284	1.569286	-1.045021
O	-3.037809	3.649798	-0.582517
N	-1.646890	0.433414	0.190875
C	-2.341332	0.025664	1.404220
O	-2.244684	-1.379455	1.438988
C	-1.590373	-1.913346	0.257181
C	-1.208876	-0.641112	-0.530261
O	-0.603009	-0.586656	-1.592158
C	-2.553078	-2.824266	-0.531552
C	-2.880288	-4.092114	0.269610
C	-3.831733	-2.090084	-0.955763
O	-0.482989	-2.664067	0.600328
C	2.486172	2.962797	-0.926378
C	3.567043	3.678128	-0.109960
O	1.551759	-0.970136	1.357380
C	5.330663	-3.241242	-0.792131
H	-4.561809	2.089276	-1.280003
H	0.219508	-2.085797	0.986464
H	1.101718	-0.117891	1.529394
H	4.847927	-1.189944	-1.247545
H	3.632659	-2.340644	-1.784039
H	3.008580	-2.801945	0.614581

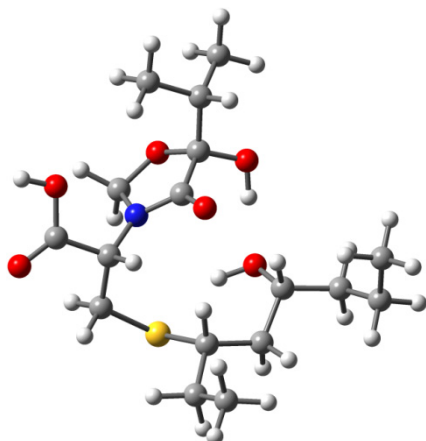
H	4.158365	-1.586349	1.152915
H	1.788550	-1.033149	-0.702191
H	3.470804	0.884040	0.993367
H	3.676052	0.632573	-0.734438
H	1.176747	1.251766	-0.988942
H	-0.539155	3.676079	0.088489
H	-1.259065	2.981398	1.523892
H	-0.981205	1.670001	-1.250201
H	-3.394937	0.339410	1.370429
H	-1.864667	0.459429	2.295384
H	-1.994037	-3.107417	-1.432773
H	-3.417000	-3.838808	1.190864
H	-3.518694	-4.756926	-0.323777
H	-1.970905	-4.632528	0.541206
H	-4.412907	-1.783128	-0.078602
H	-3.623028	-1.198172	-1.556698
H	-4.462286	-2.753940	-1.557555
H	2.900597	2.660340	-1.899250
H	1.675014	3.667312	-1.153363
H	4.441868	3.039171	0.053891
H	3.909231	4.575934	-0.635903
H	3.185838	3.986543	0.869200
H	6.044556	-3.022344	0.011340
H	5.902790	-3.399430	-1.713253
H	4.830579	-4.184591	-0.542350



13b14

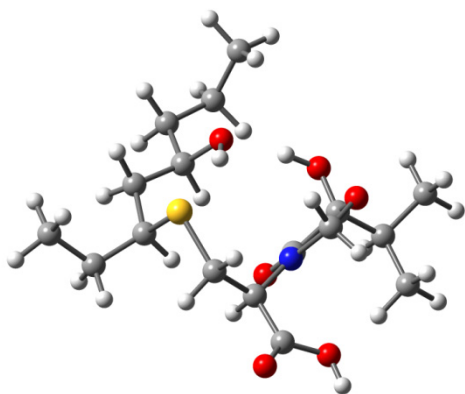
C	4.526382	-1.831594	0.315661
C	3.362027	-1.723613	-0.677938
C	2.330578	-0.631613	-0.370585
C	2.929579	0.785785	-0.340191
C	1.926156	1.959267	-0.407610
S	1.017306	2.066032	1.224413
C	-0.693771	2.568703	0.800125
C	-1.508297	1.598810	-0.083002
C	-2.890939	2.221407	-0.338495
O	-3.868788	1.299258	-0.453686
O	-3.082211	3.410779	-0.457298
N	-1.554871	0.235739	0.383029
C	-2.031708	-0.209885	1.683714
O	-1.902321	-1.611406	1.668709
C	-1.463319	-2.111824	0.375604
C	-1.258676	-0.815292	-0.440364
O	-0.868144	-0.715913	-1.595813
C	-2.544842	-3.056746	-0.189477
C	-3.908062	-2.365504	-0.325354
C	-2.108276	-3.711923	-1.508124
O	-0.294125	-2.835843	0.507575
C	2.642125	3.276298	-0.756138
C	1.742540	4.504898	-0.908898
O	1.719448	-0.981975	0.890592
C	5.435810	-3.029556	0.022188
H	-4.687800	1.791382	-0.655945
H	0.450116	-2.228257	0.736098
H	1.278619	-0.180520	1.239088
H	4.118782	-1.913950	1.329798
H	5.126549	-0.911564	0.293760
H	3.746217	-1.558431	-1.694605

H	2.820632	-2.678809	-0.705676
H	1.561175	-0.663809	-1.154620
H	3.574068	0.899152	0.541373
H	3.585553	0.883208	-1.215997
H	1.173932	1.735359	-1.173819
H	-0.699581	3.548841	0.322759
H	-1.175516	2.691400	1.776405
H	-1.044206	1.527193	-1.076438
H	-3.082181	0.081523	1.831708
H	-1.422807	0.216635	2.494316
H	-2.628877	-3.839735	0.576589
H	-3.879960	-1.559813	-1.069108
H	-4.662723	-3.089155	-0.653113
H	-4.240855	-1.942947	0.627904
H	-1.983496	-2.965161	-2.298615
H	-1.158942	-4.238084	-1.38513
H	-2.867118	-4.433468	-1.833538
H	3.408627	3.473134	0.004889
H	3.179926	3.107293	-1.700032
H	1.267355	4.774806	0.039860
H	2.329141	5.368931	-1.239150
H	0.954362	4.337673	-1.653709
H	4.877602	-3.972011	0.078405
H	6.261915	-3.088463	0.740031
H	5.871979	-2.963934	-0.982624

**13b15**

C	4.526382	-1.831594	0.315661
C	3.362027	-1.723613	-0.677938
C	2.330578	-0.631613	-0.370585
C	2.929579	0.785785	-0.340191
C	1.926156	1.959267	-0.40761
S	1.017306	2.066032	1.224413
C	-0.693771	2.568703	0.800125
C	-1.508297	1.59881	-0.083002
C	-2.890939	2.221407	-0.338495
O	-3.868788	1.299258	-0.453686
O	-3.082211	3.410779	-0.457298
N	-1.554871	0.235739	0.383029
C	-2.031708	-0.209885	1.683714
O	-1.902321	-1.611406	1.668709
C	-1.463319	-2.111824	0.375604
C	-1.258676	-0.815292	-0.440364
O	-0.868144	-0.715913	-1.595813
C	-2.544842	-3.056746	-0.189477
C	-3.908062	-2.365504	-0.325354
C	-2.108276	-3.711923	-1.508124
O	-0.294125	-2.835843	0.507575
C	2.642125	3.276298	-0.756138
C	1.742540	4.504898	-0.908898
O	1.719448	-0.981975	0.890592
C	5.435810	-3.029556	0.022188
H	-4.687800	1.791382	-0.655945
H	0.450116	-2.228257	0.736098
H	1.278619	-0.180520	1.239088
H	4.118782	-1.913950	1.329798
H	5.126549	-0.911564	0.293760
H	3.746217	-1.558431	-1.694605

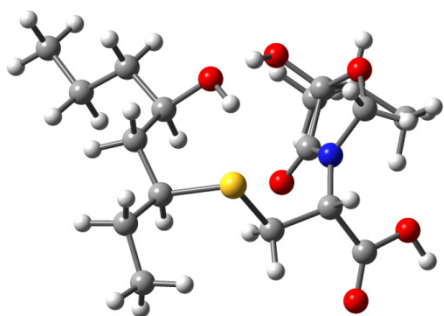
H	2.820632	-2.678809	-0.705676
H	1.561175	-0.663809	-1.154620
H	3.574068	0.899152	0.541373
H	3.585553	0.883208	-1.215997
H	1.173932	1.735359	-1.173819
H	-0.699581	3.548841	0.322759
H	-1.175516	2.691400	1.776405
H	-1.044206	1.527193	-1.076438
H	-3.082181	0.081523	1.831708
H	-1.422807	0.216635	2.494316
H	-2.628877	-3.839735	0.576589
H	-3.879960	-1.559813	-1.069108
H	-4.662723	-3.089155	-0.653113
H	-4.240855	-1.942947	0.627904
H	-1.983496	-2.965161	-2.298615
H	-1.158942	-4.238084	-1.385130
H	-2.867118	-4.433468	-1.833538
H	3.408627	3.473134	0.004889
H	3.179926	3.107293	-1.700032
H	1.267355	4.774806	0.039860
H	2.329141	5.368931	-1.239150
H	0.954362	4.337673	-1.653709
H	4.877602	-3.972011	0.078405
H	6.261915	-3.088463	0.740031
H	5.871979	-2.963934	-0.982624



13b12

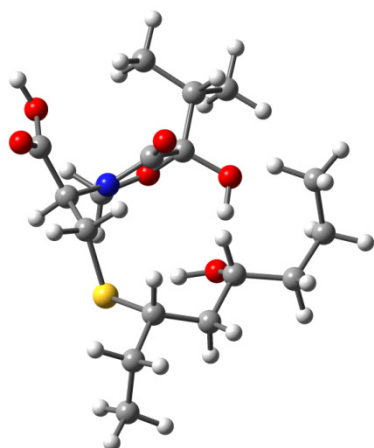
C	-2.118433	4.018294	-0.547223
C	-2.977678	2.735072	-0.571252
C	-2.202463	1.429856	-0.371686
C	-3.135963	0.206188	-0.398378
C	-2.433617	-1.166600	-0.493572
S	-1.736625	-1.593406	1.186675
C	-0.364257	-2.746017	0.819095
C	0.769192	-2.209439	-0.084101
C	1.866890	-3.278419	-0.189333
O	3.049782	-2.763387	-0.586697
O	1.693374	-4.457488	0.020438
N	1.274722	-0.902670	0.260534
C	1.961602	-0.547243	1.494237
O	2.272795	0.821505	1.370274
C	1.908764	1.349294	0.067687
C	1.237029	0.141075	-0.619801
O	0.734564	0.114523	-1.735213
C	3.158876	1.836213	-0.692779
C	3.769395	3.066541	-0.007443
C	4.200900	0.723550	-0.866896
O	1.044163	2.420617	0.193895
C	-3.340101	-2.284003	-1.043223
C	-4.638923	-2.532909	-0.270363
O	-1.472514	1.517921	0.873087
C	-1.925122	4.629655	0.846352
H	3.665784	-3.517003	-0.666047
H	0.170162	2.121090	0.544357
H	-1.309321	0.607123	1.193432
H	-2.596423	4.765967	-1.193780
H	-1.138588	3.808551	-0.996024
H	-3.771210	2.803285	0.186549

H	-3.479400	2.654696	-1.545180
H	-1.473092	1.329313	-1.188936
H	-3.810070	0.245264	0.467720
H	-3.771949	0.298881	-1.289054
H	-1.575777	-1.051630	-1.164988
H	-0.750828	-3.666047	0.375526
H	0.025926	-3.02021	1.804447
H	0.390986	-2.082883	-1.108014
H	2.878663	-1.143283	1.610769
H	1.313195	-0.708809	2.367535
H	2.786448	2.128751	-1.683069
H	4.123831	2.812945	0.997977
H	4.624782	3.432175	-0.587237
H	3.037920	3.872671	0.081126
H	4.592637	0.403137	0.105344
H	3.794057	-0.155614	-1.378588
H	5.044595	1.091373	-1.461252
H	-3.576825	-2.022057	-2.084865
H	-2.761648	-3.215864	-1.093312
H	-5.292679	-1.653729	-0.279779
H	-5.195907	-3.361816	-0.720308
H	-4.436119	-2.791835	0.774128
H	-2.892094	4.895564	1.292619
H	-1.322396	5.543503	0.789623
H	-1.425561	3.933497	1.52455

**13c4**

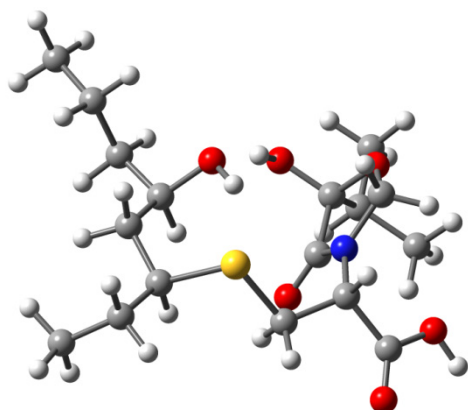
C	-3.485043	2.923248	-1.011257
C	-2.751551	2.535645	0.279594
C	-2.168935	1.119433	0.288416
C	-3.238961	0.017656	0.386241
C	-2.813852	-1.393688	-0.061968
S	-1.383178	-2.052261	0.958413
C	-0.094781	-2.332056	-0.326539
C	1.320897	-2.104274	0.232076
C	2.352825	-2.646274	-0.777208
O	3.571695	-2.095457	-0.593277
O	2.127598	-3.506155	-1.595572
N	1.587702	-0.730645	0.615808
C	2.230908	-0.366266	1.871765
O	2.474891	1.015302	1.785778
C	2.006581	1.577069	0.531635
C	1.530407	0.326294	-0.246879
O	1.138508	0.275142	-1.406352
C	3.170530	2.343102	-0.128606
C	4.388153	1.444883	-0.382922
C	2.730987	3.077008	-1.404391
O	0.976063	2.475642	0.751162
C	-3.994064	-2.380557	-0.034290
C	-3.717115	-3.726745	-0.707058
O	-1.282589	1.059868	1.425576
C	-3.967737	4.377876	-0.994182
H	4.161799	-2.503730	-1.255148
H	0.188245	1.996893	1.106566
H	-1.033362	0.117967	1.534253
H	-4.347431	2.262591	-1.175087

H	-2.814464	2.771336	-1.868422
H	-1.913519	3.227458	0.432901
H	-3.415905	2.653345	1.147255
H	-1.580143	0.975339	-0.631749
H	-3.615029	-0.005408	1.418118
H	-4.089943	0.297191	-0.248403
H	-2.423725	-1.332985	-1.084897
H	-0.252546	-1.641339	-1.155551
H	-0.158295	-3.354986	-0.699631
H	1.451758	-2.715952	1.135753
H	3.177798	-0.913537	1.991619
H	1.574555	-0.593619	2.725786
H	3.445825	3.093149	0.625527
H	4.163137	0.663794	-1.118974
H	5.217256	2.042189	-0.778555
H	4.729949	0.962345	0.537964
H	2.425556	2.368861	-2.180623
H	1.889211	3.742468	-1.199720
H	3.562723	3.677181	-1.792220
H	-4.306411	-2.537633	1.006618
H	-4.841046	-1.892488	-0.537203
H	-2.901367	-4.260571	-0.208435
H	-4.605647	-4.366449	-0.673013
H	-3.442638	-3.594498	-1.760968
H	-4.663344	4.555392	-0.164861
H	-4.484580	4.636972	-1.925014
H	-3.126309	5.070556	-0.874231

**13c2**

C	0.810476	4.083039	0.678873
C	2.107451	3.295047	0.427440
C	1.943504	1.786528	0.227715
C	3.305227	1.095028	0.018412
C	3.353969	-0.414853	0.315429
S	2.167340	-1.394762	-0.760180
C	1.032227	-2.084413	0.515179
C	-0.350179	-2.393499	-0.082085
C	-1.154014	-3.249521	0.915963
O	-2.477595	-3.21593	0.650121
O	-0.667456	-3.926437	1.790122
N	-1.073547	-1.211266	-0.511100
C	-1.698455	-1.087119	-1.822376
O	-2.358141	0.154430	-1.811282
C	-2.264542	0.807536	-0.517951
C	-1.448333	-0.199970	0.323834
O	-1.157448	-0.102747	1.509329
C	-3.670957	1.067841	0.053781
C	-4.416327	2.113569	-0.787528
C	-4.488224	-0.223011	0.189090
O	-1.614238	2.024418	-0.623409
C	4.774972	-1.004883	0.229599
C	5.444272	-0.929812	-1.146681
O	1.099765	1.584485	-0.925098
C	0.052480	3.672282	1.947208
H	-2.906592	-3.792770	1.310607
H	-0.653149	1.886184	-0.802292
H	1.175765	0.635800	-1.158278
H	0.146355	3.992080	-0.187699

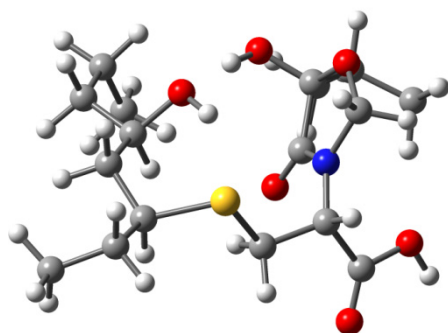
H	1.078944	5.146006	0.745499
H	2.617090	3.700317	-0.457559
H	2.785242	3.443518	1.280298
H	1.449437	1.354465	1.111142
H	3.634605	1.304326	-1.006525
H	4.041765	1.564508	0.685802
H	2.984853	-0.572707	1.334892
H	0.904412	-1.363787	1.324188
H	1.448288	-3.006357	0.923501
H	-0.225045	-3.027755	-0.970875
H	-2.416633	-1.905355	-1.984442
H	-0.939133	-1.112227	-2.618232
H	-3.494004	1.478433	1.056150
H	-4.580132	1.744784	-1.806351
H	-5.394979	2.325756	-0.341530
H	-3.851997	3.046747	-0.848467
H	-4.678375	-0.668551	-0.793984
H	-3.982506	-0.969322	0.811118
H	-5.457582	-0.006253	0.651509
H	5.395020	-0.472384	0.965490
H	4.733646	-2.050685	0.556816
H	5.582140	0.103965	-1.481208
H	6.433401	-1.399179	-1.113799
H	4.853176	-1.456549	-1.904481
H	-0.35139	2.657669	1.873415
H	-0.795927	4.343937	2.119628
H	0.700309	3.721955	2.832571



13c3

C	-3.984608	2.603347	0.545247
C	-2.986620	2.155986	-0.531421
C	-2.239361	0.852075	-0.234604
C	-3.162529	-0.368452	-0.060393
C	-2.487155	-1.738583	-0.253982
S	-1.210296	-2.047271	1.085914
C	0.260532	-2.547863	0.099340
C	1.567241	-1.979343	0.684070
C	2.762107	-2.666629	-0.007823
O	3.876913	-1.906396	0.031996
O	2.731950	-3.778409	-0.480666
N	1.655986	-0.531793	0.649840
C	2.180244	0.249485	1.764911
O	2.346862	1.556159	1.272063
C	1.822672	1.693134	-0.069722
C	1.520942	0.230846	-0.475514
O	1.191898	-0.168525	-1.584631
C	2.869568	2.359059	-0.980229
C	3.114380	3.814853	-0.558633
C	4.181760	1.565911	-1.031083
O	0.676465	2.474853	-0.091856
C	-3.479798	-2.915387	-0.302656
C	-4.423823	-2.891680	-1.512829
O	-1.446261	1.082757	0.949815
C	-4.612482	3.964827	0.229257
H	4.579731	-2.423563	-0.406013
H	-0.04634	2.029116	0.413206
H	-1.119792	0.205518	1.242058
H	-3.468013	2.646961	1.510986

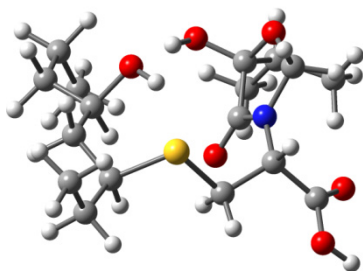
H	-4.782150	1.855106	0.651978
H	-3.500000	2.043481	-1.497030
H	-2.230545	2.939309	-0.675056
H	-1.559440	0.654701	-1.077832
H	-3.651882	-0.321799	0.921064
H	-3.960425	-0.293378	-0.809954
H	-1.914636	-1.712855	-1.188831
H	0.148593	-2.178113	-0.920321
H	0.342279	-3.634968	0.078664
H	1.639151	-2.274955	1.740333
H	3.149471	-0.149845	2.094771
H	1.476490	0.233303	2.612079
H	2.414333	2.348532	-1.978739
H	3.550442	3.858285	0.445770
H	3.814183	4.294066	-1.253123
H	2.183443	4.386107	-0.552499
H	4.656754	1.535230	-0.044315
H	4.026748	0.535725	-1.369063
H	4.880564	2.042799	-1.727401
H	-2.904632	-3.848472	-0.318034
H	-4.062450	-2.932346	0.627911
H	-3.862589	-2.843462	-2.454153
H	-5.031252	-3.803063	-1.536389
H	-5.113838	-2.041612	-1.490035
H	-3.846163	4.746130	0.157293
H	-5.323233	4.265914	1.007295
H	-5.153010	3.944007	-0.725512



13c1

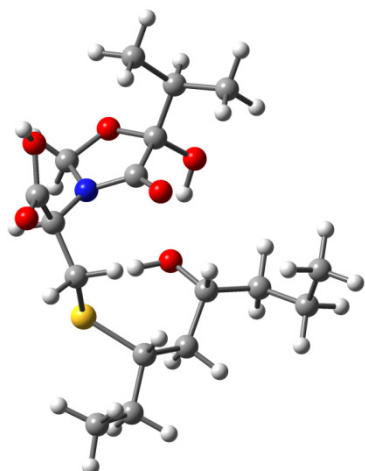
C	1.042817	3.970452	0.499536
C	2.279562	3.110409	0.190368
C	2.018451	1.615528	-0.013445
C	3.328428	0.850710	-0.290734
C	3.32631	-0.660927	-0.000264
S	1.984769	-1.570850	-0.944691
C	0.865777	-2.068255	0.430214
C	-0.553694	-2.346588	-0.089021
C	-1.367688	-3.059033	1.007688
O	-2.695075	-2.979866	0.775737
O	-0.886971	-3.678078	1.926941
N	-1.221257	-1.161812	-0.592353
C	-1.788374	-1.053833	-1.929181
O	-2.342119	0.235885	-1.996355
C	-2.285393	0.923932	-0.715836
C	-1.544330	-0.091265	0.186350
O	-1.257838	0.032340	1.371515
C	-3.722339	1.261254	-0.266607
C	-4.606224	0.011241	-0.161838
C	-3.748751	2.081973	1.031225
O	-1.587532	2.110976	-0.839429
C	4.678697	-1.336867	-0.296491
C	5.846426	-0.808520	0.548110
O	1.108381	1.477555	-1.123419
C	0.314405	3.591938	1.794821
H	-3.130281	-3.466958	1.501118
H	-0.630933	1.923936	-0.992941
H	1.115646	0.529880	-1.369830
H	0.340731	3.926606	-0.340261

H	1.375549	5.015258	0.562679
H	2.776571	3.493201	-0.711612
H	2.998343	3.210583	1.016354
H	1.544645	1.204829	0.891227
H	3.617700	1.033706	-1.334705
H	4.116352	1.291198	0.333072
H	3.077109	-0.817303	1.056456
H	0.810966	-1.268057	1.169485
H	1.247455	-2.970192	0.910802
H	-0.502183	-3.061041	-0.922342
H	-2.563590	-1.821323	-2.080793
H	-1.008811	-1.175535	-2.695609
H	-4.106615	1.888740	-1.082501
H	-4.258793	-0.663021	0.630210
H	-5.635106	0.300390	0.079581
H	-4.627985	-0.545839	-1.103876
H	-3.337398	1.510172	1.868795
H	-3.163186	2.998037	0.925688
H	-4.781934	2.356087	1.275643
H	4.566772	-2.413227	-0.123110
H	4.911241	-1.221525	-1.363766
H	5.623855	-0.874431	1.620417
H	6.747164	-1.403085	0.360567
H	6.089755	0.234096	0.318928
H	-0.154206	2.604848	1.729541
H	-0.482398	4.312456	2.010971
H	1.000829	3.590402	2.652069

**13c10**

C	1.042817	3.970452	0.499536
C	2.279562	3.110409	0.190368
C	2.018451	1.615528	-0.013445
C	3.328428	0.850710	-0.290734
C	3.326310	-0.660927	-0.000264
S	1.984769	-1.570850	-0.944691
C	0.865777	-2.068255	0.430214
C	-0.553694	-2.346588	-0.089021
C	-1.367688	-3.059033	1.007688
O	-2.695075	-2.979866	0.775737
O	-0.886971	-3.678078	1.926941
N	-1.221257	-1.161812	-0.592353
C	-1.788374	-1.053833	-1.929181
O	-2.342119	0.235885	-1.996355
C	-2.285393	0.923932	-0.715836
C	-1.544330	-0.091265	0.186350
O	-1.257838	0.032340	1.371515
C	-3.722339	1.261254	-0.266607
C	-4.606224	0.011241	-0.161838
C	-3.748751	2.081973	1.031225
O	-1.587532	2.110976	-0.839429
C	4.678697	-1.336867	-0.296491
C	5.846426	-0.808520	0.548110
O	1.108381	1.477555	-1.123419
C	0.314405	3.591938	1.794821
H	-3.130281	-3.466958	1.501118
H	-0.630933	1.923936	-0.992941
H	1.115646	0.529880	-1.369830
H	0.340731	3.926606	-0.340261
H	1.375549	5.015258	0.562679
H	2.776571	3.493201	-0.711612

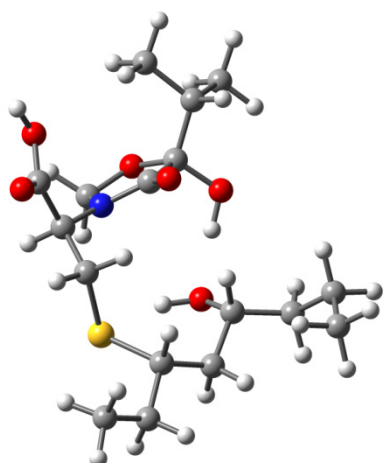
H	2.998343	3.210583	1.016354
H	1.544645	1.204829	0.891227
H	3.617700	1.033706	-1.334705
H	4.116352	1.291198	0.333072
H	3.077109	-0.817303	1.056456
H	0.810966	-1.268057	1.169485
H	1.247455	-2.970192	0.910802
H	-0.502183	-3.061041	-0.922342
H	-2.563590	-1.821323	-2.080793
H	-1.008811	-1.175535	-2.695609
H	-4.106615	1.888740	-1.082501
H	-4.258793	-0.663021	0.630210
H	-5.635106	0.300390	0.079581
H	-4.627985	-0.545839	-1.103876
H	-3.337398	1.510172	1.868795
H	-3.163186	2.998037	0.925688
H	-4.781934	2.356087	1.275643
H	4.566772	-2.413227	-0.123110
H	4.911241	-1.221525	-1.363766
H	5.623855	-0.874431	1.620417
H	6.747164	-1.403085	0.360567
H	6.089755	0.234096	0.318928
H	-0.154206	2.604848	1.729541
H	-0.482398	4.312456	2.010971
H	1.000829	3.590402	2.652069



13c6

C	2.955379	3.631161	0.755766
C	2.329870	3.032357	-0.515479
C	1.981258	1.541213	-0.449044
C	3.221024	0.630433	-0.484220
C	3.029841	-0.805085	0.040343
S	1.759287	-1.747959	-0.969294
C	0.539216	-2.246962	0.315264
C	-0.896194	-2.261508	-0.240519
C	-1.820421	-2.963843	0.774184
O	-3.112816	-2.612809	0.603792
O	-1.453578	-3.779089	1.587116
N	-1.391751	-0.955588	-0.633071
C	-2.101882	-0.720549	-1.883744
O	-2.582031	0.598166	-1.805404
C	-2.174844	1.255628	-0.577907
C	-1.482652	0.115321	0.208677
O	-1.058300	0.155424	1.357284
C	-3.429373	1.836639	0.104895
C	-4.470170	0.755175	0.422960
C	-3.080627	2.669417	1.347458
O	-1.309539	2.304072	-0.843970
C	4.359988	-1.576512	0.095487
C	4.288529	-2.924827	0.815374
O	1.132818	1.283880	-1.589314
C	2.014402	3.674271	1.966941
H	-3.624686	-3.112807	1.267903
H	-0.471385	1.953654	-1.233073
H	1.045237	0.309878	-1.653461

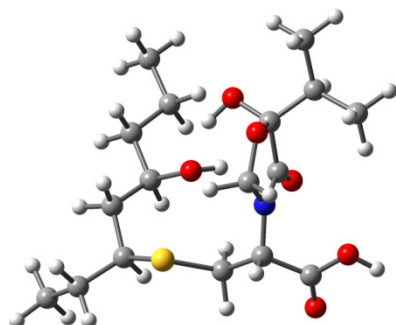
H	3.276961	4.653779	0.519624
H	3.873995	3.089094	1.021661
H	1.400700	3.571102	-0.740886
H	2.997089	3.191010	-1.373560
H	1.407480	1.340138	0.467442
H	3.608458	0.615162	-1.512010
H	4.005968	1.082833	0.136288
H	2.604260	-0.753065	1.049531
H	0.581322	-1.541248	1.145482
H	0.775198	-3.245556	0.684724
H	-0.923240	-2.892580	-1.140049
H	-2.941167	-1.423744	-1.988425
H	-1.424017	-0.840376	-2.743186
H	-3.849709	2.508238	-0.656333
H	-4.099719	0.053479	1.179978
H	-5.381190	1.217394	0.819139
H	-4.741956	0.185374	-0.470961
H	-2.634481	2.044909	2.127371
H	-2.371564	3.462210	1.098312
H	-3.989599	3.130293	1.752148
H	4.736296	-1.716243	-0.926520
H	5.090756	-0.932746	0.605588
H	3.601735	-3.610500	0.308179
H	5.274924	-3.400194	0.844473
H	3.946136	-2.804865	1.850740
H	1.094471	4.221439	1.729473
H	2.493632	4.175997	2.815412
H	1.719249	2.673288	2.300555



13c11

C	2.179716	3.748053	1.154889
C	2.030613	3.178617	-0.26676
C	1.823201	1.657601	-0.348735
C	3.134171	0.871184	-0.53547
C	3.113915	-0.617201	-0.138718
S	1.822964	-1.588619	-1.092899
C	0.710271	-2.171315	0.253114
C	-0.749491	-2.277926	-0.222309
C	-1.557755	-3.092416	0.807952
O	-2.882415	-2.849277	0.710748
O	-1.084054	-3.901698	1.56975
N	-1.364043	-0.998227	-0.521663
C	-2.151579	-0.750162	-1.723915
O	-2.763128	0.501602	-1.526982
C	-2.312217	1.133283	-0.304275
C	-1.507906	0.009378	0.388406
O	-1.052196	0.021846	1.524427
C	-3.520337	1.602212	0.524918
C	-4.257753	2.748318	-0.181741
C	-4.473612	0.448658	0.861738
O	-1.513999	2.237490	-0.564590
C	4.500183	-1.264470	-0.302746
C	4.634404	-2.658287	0.314598
O	0.947174	1.424681	-1.475157
C	3.412661	3.290873	1.943985
H	-3.316616	-3.414537	1.377800
H	-0.680393	1.951244	-1.011138
H	0.939326	0.455652	-1.622721
H	1.273277	3.503917	1.725153
H	2.200672	4.842740	1.075005
H	1.149739	3.643003	-0.724047

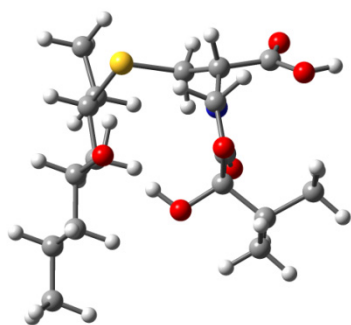
H	2.890086	3.467009	-0.888809
H	1.314794	1.318587	0.567714
H	3.445408	0.981612	-1.583281
H	3.917963	1.342521	0.069453
H	2.804632	-0.697730	0.910293
H	0.750824	-1.470111	1.087372
H	1.032911	-3.153921	0.599305
H	-0.782700	-2.870968	-1.147035
H	-2.920781	-1.525532	-1.849160
H	-1.505334	-0.737184	-2.615465
H	-3.084221	1.980830	1.458207
H	-4.681467	2.407785	-1.133276
H	-5.080849	3.108635	0.446254
H	-3.584486	3.583605	-0.386747
H	-4.918003	0.032297	-0.049032
H	-3.966074	-0.361379	1.396335
H	-5.287753	0.810005	1.499841
H	4.755691	-1.299884	-1.370144
H	5.232711	-0.590651	0.163743
H	3.949714	-3.370784	-0.156985
H	5.653495	-3.039731	0.188882
H	4.416790	-2.638157	1.389658
H	3.386254	2.217369	2.165204
H	3.472650	3.815111	2.904549
H	4.340659	3.498587	1.395925



13c5

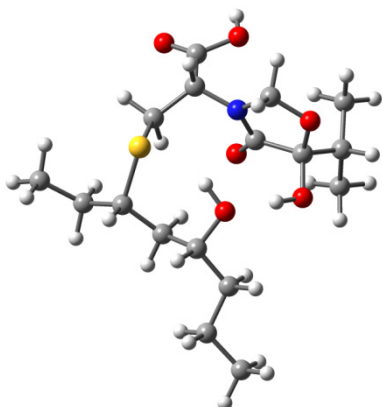
C	1.805969	3.614392	1.349313
C	2.638113	2.759795	0.383804
C	2.370069	1.252147	0.499924
C	3.143910	0.445769	-0.546643
C	3.153840	-1.089964	-0.381142
S	1.617398	-1.920719	-1.040624
C	0.634453	-2.170925	0.492981
C	-0.855459	-2.366944	0.166457
C	-1.600307	-2.879958	1.412066
O	-2.939467	-2.768808	1.277640
O	-1.069027	-3.39595	2.366626
N	-1.496882	-1.184279	-0.381609
C	-1.857848	-1.023332	-1.784425
O	-2.438237	0.258336	-1.872116
C	-2.251598	1.005517	-0.654233
C	-1.715126	-0.054008	0.330208
O	-1.473880	0.108099	1.524631
C	-3.587784	1.626613	-0.214037
C	-4.038733	2.718203	-1.194849
C	-4.675174	0.561328	-0.021303
O	-1.322811	2.036459	-0.811964
C	4.366543	-1.741681	-1.082135
C	5.720899	-1.409830	-0.441039
O	0.973132	0.967588	0.331947
C	2.141473	5.106738	1.261072
H	-3.323582	-3.125574	2.100780
H	-0.413811	1.676544	-0.742606
H	0.482966	1.126792	1.157090
H	1.967440	3.264851	2.380112

H	0.740279	3.470578	1.130807
H	2.434355	3.074176	-0.649842
H	3.708095	2.938267	0.562875
H	2.674810	0.913764	1.503771
H	2.765306	0.703021	-1.543910
H	4.182061	0.799379	-0.506825
H	3.196242	-1.347356	0.685132
H	0.737151	-1.293136	1.128963
H	0.990583	-3.050992	1.031571
H	-0.965399	-3.162263	-0.584059
H	-2.595995	-1.780150	-2.084776
H	-0.967579	-1.104892	-2.423453
H	-3.371781	2.088805	0.757878
H	-4.241611	2.291011	-2.183286
H	-4.959785	3.190267	-0.833761
H	-3.273793	3.490423	-1.306561
H	-4.920987	0.081230	-0.974655
H	-4.367098	-0.218135	0.684871
H	-5.588649	1.022826	0.370064
H	4.225557	-2.827610	-1.068930
H	4.373224	-1.445988	-2.140607
H	5.738171	-1.699443	0.616973
H	6.523414	-1.957877	-0.947081
H	5.969294	-0.344582	-0.499803
H	3.193530	5.294264	1.508777
H	1.525768	5.693018	1.952060
H	1.964537	5.491282	0.249444

**13d1**

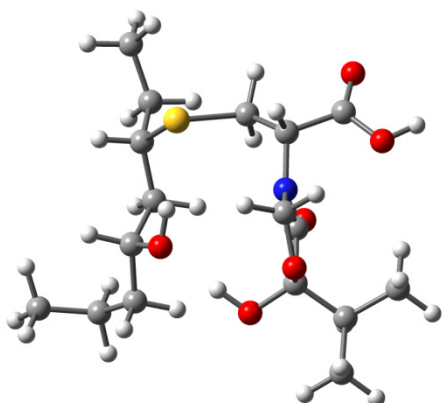
C	0.639270	4.564159	0.372771
C	1.165681	3.438384	-0.527596
C	1.791721	2.272608	0.241302
C	2.378883	1.207757	-0.701885
C	3.298304	0.158601	-0.044356
S	2.405567	-0.982162	1.135679
C	1.428565	-2.043749	-0.005571
C	0.052798	-2.401242	0.582597
C	-0.536760	-3.598505	-0.190580
O	-1.878170	-3.670708	-0.053861
O	0.115773	-4.418052	-0.792522
N	-0.864201	-1.279312	0.641705
C	-1.665506	-0.954056	1.815920
O	-2.609375	-0.005395	1.378914
C	-2.316877	0.450786	0.038757
C	-1.277540	-0.579810	-0.455264
O	-0.866273	-0.726525	-1.598731
C	-3.601250	0.463556	-0.804626
C	-4.268810	-0.916905	-0.858228
C	-4.576864	1.538692	-0.305589
O	-1.780426	1.733471	0.036048
C	4.147586	-0.602478	-1.078872
C	5.215585	-1.529011	-0.492241
O	0.773431	1.735327	1.105254
C	0.024505	5.716784	-0.427051
H	-2.164173	-4.459843	-0.552288
H	-0.899374	1.726642	0.479168
H	1.098235	0.876969	1.445944
H	1.462139	4.943472	0.995881
H	-0.107729	4.156291	1.062694
H	0.347325	3.046937	-1.146842

H	1.921977	3.843006	-1.214749
H	2.606369	2.664309	0.874983
H	1.562891	0.725738	-1.255518
H	2.988137	1.735937	-1.448868
H	3.981417	0.676522	0.643565
H	1.973815	-2.969230	-0.194274
H	1.272794	-1.530460	-0.954842
H	0.184072	-2.760992	1.612634
H	-1.031815	-0.544191	2.617904
H	-2.187169	-1.846019	2.189558
H	-3.264471	0.728985	-1.814871
H	-4.614709	-1.221174	0.135658
H	-5.137629	-0.887815	-1.525187
H	-3.586388	-1.686947	-1.233700
H	-4.915442	1.312892	0.711915
H	-4.107566	2.525112	-0.298297
H	-5.458753	1.576747	-0.955582
H	3.488028	-1.164429	-1.752612
H	4.636632	0.155303	-1.706783
H	4.773347	-2.333488	0.103657
H	5.806409	-1.985981	-1.293447
H	5.904662	-0.976435	0.157987
H	0.756324	6.165661	-1.110801
H	-0.341225	6.509175	0.235771
H	-0.823219	5.368710	-1.029193

**13d2**

C	-4.281271	-2.427148	-0.383460
C	-2.886746	-2.195303	0.212850
C	-2.633302	-0.777264	0.735378
C	-2.516390	0.273426	-0.382577
C	-2.595205	1.745279	0.070860
S	-1.134912	2.285246	1.107636
C	0.212478	2.390153	-0.140901
C	1.561686	1.909800	0.421083
C	2.695698	2.375456	-0.515188
O	3.809011	1.626947	-0.364775
O	2.631168	3.332275	-1.250338
N	1.614889	0.484259	0.682180
C	2.150520	-0.084702	1.912390
O	2.293926	-1.460658	1.659953
C	1.706449	-1.837583	0.390346
C	1.442464	-0.468514	-0.280025
O	1.107956	-0.254259	-1.439210
C	2.708180	-2.742016	-0.352547
C	2.114788	-3.325252	-1.643720
C	4.043413	-2.032021	-0.613912
O	0.530553	-2.551257	0.571973
C	-2.877860	2.704943	-1.099245
C	-3.173182	4.152648	-0.699256
O	-1.437048	-0.851016	1.533436
C	-4.505885	-3.887416	-0.791169
H	4.475049	1.997432	-0.974722
H	-0.151239	-1.968419	0.981972
H	-1.143240	0.066297	1.708839
H	-4.433423	-1.784127	-1.260676
H	-5.045143	-2.130998	0.349952

H	-2.742920	-2.875844	1.062301
H	-2.109213	-2.449662	-0.519834
H	-3.470052	-0.493574	1.396900
H	-1.599393	0.084991	-0.955436
H	-3.352429	0.116852	-1.077043
H	-3.414039	1.841571	0.797617
H	0.325589	3.425385	-0.464515
H	-0.035178	1.778847	-1.009033
H	1.752052	2.415489	1.377934
H	1.465120	0.095622	2.755342
H	3.131008	0.353399	2.146713
H	2.886618	-3.566791	0.351156
H	1.882312	-2.533169	-2.361942
H	2.835205	-4.010385	-2.106309
H	1.196019	-3.878497	-1.435837
H	3.920616	-1.200459	-1.318077
H	4.475286	-1.639227	0.311472
H	4.760913	-2.734091	-1.052996
H	-2.042959	2.672425	-1.810900
H	-3.744148	2.298955	-1.639960
H	-2.320151	4.617361	-0.195289
H	-3.411722	4.752294	-1.584342
H	-4.030404	4.207426	-0.017296
H	-3.775443	-4.204009	-1.545145
H	-5.506896	-4.033859	-1.212253
H	-4.402963	-4.558160	0.070220

**13d3**

C	-3.670539	-3.131990	-0.989159
C	-2.396588	-2.705535	-0.241162
C	-2.440306	-1.342364	0.461016
C	-2.531022	-0.160220	-0.518461
C	-2.862869	1.208968	0.110071
S	-1.501453	1.880175	1.201697
C	-0.217459	2.356633	-0.026242
C	1.205264	2.088423	0.494156
C	2.218537	2.847842	-0.386624
O	3.457150	2.317343	-0.297869
O	1.963995	3.838176	-1.030363
N	1.526708	0.679637	0.616079
C	2.180555	0.105873	1.786530
O	2.555951	-1.197126	1.411302
C	2.032383	-1.547998	0.108637
C	1.514660	-0.195834	-0.430911
O	1.132587	0.048497	-1.568035
C	3.146894	-2.156481	-0.758954
C	4.335849	-1.201582	-0.926107
C	3.594006	-3.515200	-0.201311
O	1.003596	-2.475416	0.202154
C	-3.340817	2.232863	-0.935775
C	-3.891825	3.541169	-0.363072
O	-1.252851	-1.282812	1.274690
C	-4.907296	-3.315069	-0.100231
H	4.033029	2.865047	-0.864775
H	0.226626	-2.069297	0.654051
H	-1.137978	-0.354496	1.563556
H	-3.453556	-4.082266	-1.493500
H	-3.897882	-2.419417	-1.793638
H	-2.168327	-3.452048	0.531092

H	-1.542586	-2.706236	-0.930308
H	-3.312208	-1.306822	1.133958
H	-1.606800	-0.112461	-1.108538
H	-3.338972	-0.378981	-1.229260
H	-3.669103	1.068684	0.843978
H	-0.306556	3.420269	-0.249792
H	-0.356692	1.792720	-0.948859
H	1.310487	2.527482	1.496169
H	1.492387	0.087902	2.645987
H	3.074825	0.686529	2.053342
H	2.679878	-2.310195	-1.740170
H	4.818716	-1.008391	0.038094
H	5.081816	-1.645061	-1.595085
H	4.033152	-0.240655	-1.355760
H	4.039400	-3.398067	0.792994
H	2.750672	-4.204504	-0.118759
H	4.347467	-3.96211	-0.860237
H	-2.527520	2.443014	-1.642221
H	-4.126701	1.741173	-1.525898
H	-3.131956	4.089211	0.202566
H	-4.248512	4.190973	-1.169563
H	-4.735459	3.352908	0.312071
H	-4.705498	-4.020363	0.715369
H	-5.750406	-3.708477	-0.679387
H	-5.235440	-2.372598	0.353389